

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 154**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)  
**A61K 31/282** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 31/513** (2006.01)  
**A61K 31/555** (2006.01)  
**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61K 31/7068** (2006.01)  
**A61K 33/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/US2012/062635**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13066903**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12783805 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2773426**

54 Título: **Composiciones de liposomas combinatorias para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**31.10.2011 US 201161553786 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.12.2018**

73 Titular/es:

**MALLINCKRODT LLC (100.0%)  
675 McDonnell Boulevard  
Hazelwood, MO 63042, US**

72 Inventor/es:

**YANG, JUN;  
WU, STEPHEN, H. y  
HERMAN, CLIFF, J.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 694 154 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

**Composiciones de liposomas combinatorias para el tratamiento del cáncer****5 Antecedentes de la invención**

Los liposomas se pueden utilizar como vehículos eficaces de suministro de fármacos, y se han desarrollado productos liposomales disponibles en el mercado para el tratamiento de enfermedades incluyendo el cáncer (Barenholz, Y., Curr. Opin. en Colloid & Interface Sci. 6(1):66-77 (2001)). Un liposoma es una vesícula que incluye al menos una bicapa de fosfolípido que separa una fase acuosa interior del ambiente acuoso externo. Un liposoma es capaz de transportar carga hidrófoba en la bicapa lipídica y/o carga hidrófila en el núcleo acuoso. El tamaño de los liposomas generalmente está en un intervalo de 50 a 250 nm, lo que es particularmente adecuado para la administración dirigida de agentes de quimioterapia a sitios de tumores sólidos a través de la mayor permeabilidad y retención de los tejidos cancerosos (efecto EPR) (Maeda, H., et al., J. Controlled Release. 65(1-2): 271 (2000)). La acumulación preferente de liposomas que contienen fármacos en el sitio del tumor a través de EPR proporciona un medio para localizar el fármaco, mejorar la eficacia del fármaco y reducir la toxicidad del fármaco para células o tejidos normales. Por ejemplo, se ha demostrado que Doxil™, un producto de liposomas aprobado por la FDA que contiene doxorubicina, tiene una menor toxicidad en comparación con el fármaco libre (Martin, F.J., et al., "Clinical pharmacology and antitumor efficacy of DOXIL." Medical Applications of Liposomes. Ed. D.D. Lasic. Amsterdam: Elsevier, 1998, pp 635-688). El documento US 7.273.620 B1 describe métodos y composiciones para desencadenar la administración de un agente terapéutico encapsulado desde un liposoma. En particular, los liposomas de carga opuesta y que incorporan lípidos que favorecen las estructuras no laminares se ponen en contacto *in vivo*. El documento US 5.023.087 A se refiere a un método para controlar selectivamente la velocidad de liberación de un compuesto atrapado en liposomas desde un sitio de inyección intramuscular o subcutánea. El documento WO 2004/103344 se refiere a un método para tratar el cáncer, que comprende administrar una combinación de un complejo de platino liposomal y uno o más agentes anticancerígenos adicionales. De La Maza et al., Biophysical Journal, vol. 72, 1668-1675 (1997) investigan la interacción del tensoactivo no iónico dodecilmaltosido con liposomas de fosfatidilcolina.

Sin embargo, los beneficios de los vehículos de suministro de fármacos liposómicos están limitados por inconvenientes que incluyen el metabolismo de los liposomas y la excreción desde el organismo, así como un cierto nivel de toxicidad intrínseca y efectos secundarios debidos a la distribución y el suministro sistémicos. En particular, la optimización de la velocidad de liberación del fármaco liposomal es un difícil acto de equilibrio entre la semivida *in vivo* y liberación. En general, los liposomas permeables harán que el fármaco encapsulado esté más disponible, pero causará más riesgo de toxicidad similar al fármaco libre. Por otro lado, los liposomas menos permeables pueden reducir la toxicidad, pero pueden no proporcionar la liberación de fármaco deseable para su eficacia como se muestra en una preparación de cisplatino (SPI-077) (Kim, E.S. et al., Lung Cáncer. 34(3): 427-432 (2001)). Por lo tanto, el equilibrio entre la eficacia y la seguridad en el desarrollo y la administración de productos farmacéuticos liposomales constituye un desafío importante. El documento US 7273620 describe la liberación desencadenada de fármacos liposómicos después de la mezcla de liposomas catiónicos y aniónicos.

Por consiguiente, existe la necesidad de desarrollar formulaciones y métodos de administración que superen las limitaciones de las terapias basadas en preparaciones liposomales singulares. La presente invención aborda esta y otras necesidades, proporcionando un medio para mejorar la seguridad y eficacia de los medicamentos.

**45 Breve compendio de la invención.**

La invención se refiere a una primera y segunda composiciones de acuerdo con las reivindicaciones. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico). En un aspecto, la presente invención proporciona un método para administrar un agente terapéutico a un sujeto, comprendiendo el método:

- 55 a) administrar al sujeto un liposoma que comprende un agente terapéutico; y  
b) administrar al sujeto una nanopartícula lipídica que comprende un agente activador;

60 por medio de lo cual aumenta la liberación del agente terapéutico del liposoma después de la administración de la nanopartícula lipídica, en comparación con la liberación del agente terapéutico del liposoma sin administración de la nanopartícula lipídica.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un kit para administrar un agente terapéutico a un sujeto, comprendiendo el kit:

- a) una primera composición que comprende un liposoma que contiene un agente terapéutico; y
- b) una segunda composición que comprende una nanopartícula lipídica que contiene un agente activador no iónico;

5 en donde la primera y segunda composiciones se almacenan por separado antes de la administración al sujeto.

### Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra la liberación de oxaliplatino de los liposomas terapéuticos activada por liposomas de ataque 4460-075 a (a) pH = 5,0 y (b) pH = 7,4.
- La Figura 2 muestra la liberación de cisplatino de los liposomas terapéuticos activada por cantidades variables de liposoma de ataque 4460-075 a (a) pH = 7,4 y (b) pH = 5.
- La Figura 3 muestra la liberación de 5-carboxifluoresceína (5-CF) de la Parte A del liposoma terapéutico (4460-090) al agregar la Parte B del liposoma de ataque (4460-075) a un pH = 7,4.
- 15 La Figura 4 muestra la liberación de 5-CF de la Parte A del liposoma (4460-077) al mezclar con la Parte B del liposoma (4460-075).
- La Figura 5 muestra la liberación de 5-CF de la Parte A del liposoma (4386-143) al mezclar con la Parte B del liposoma (4460-075) a pH = 7,4.
- 20 La Figura 6 muestra la liberación de 5-CF de la Parte A del liposoma (4460-090) al mezclar con la Parte B del liposoma (4460-084) a pH = 7,4.
- La Figura 7 muestra la liberación de 5-CF de la Parte A del liposoma (4460-077) al mezclar con la Parte B del liposoma (4460-084) a pH = 7,4.
- La Figura 8 muestra la liberación de 5-CF de la Parte A del liposoma (4460-090) al mezclar con la Parte B del liposoma (4384-086) a pH = 7,4.
- 25 La Figura 9 muestra la liberación de 5-CF desde la Parte A del liposoma (4460-077) al mezclar con la Parte B del liposoma (4384-086) a pH = 7,4.
- La Figura 10 muestra la liberación de 5-CF de la Parte A del liposoma (4460-090) al mezclar con la Parte B del liposoma (4460-075) a pH = 5,0.
- 30 La Figura 11 muestra la liberación de oxaliplatino del liposoma (NLICOV003F-02) al añadir el liposoma de ataque 4460-104 a pH = 7,4 y pH = 5,0.
- La Figura 12 muestra la liberación de cisplatino de los liposomas terapéuticos (NLI 4481101) al añadir liposomas de ataque (4460-104) en (a) pH = 5,0 y (b) pH = 7,4.

### Descripción detallada de la invención

- 35 **I. General**
- La presente invención se refiere al uso de múltiples composiciones lipídicas para el suministro de fármacos u otros agentes a un sujeto. Los métodos de la invención incluyen la administración de composiciones lipídicas separadas que incluyen un liposoma terapéutico y un agente de ataque. El liposoma terapéutico es un componente liposomal que contiene un agente terapéutico y/u otros agentes (p.ej., agentes de diagnóstico). El agente de ataque es una nanopartícula lipídica (un liposoma, una micela o una mezcla de los mismos) que contiene un agente activador que puede aumentar la liberación de carga del liposoma terapéutico. En el presente contexto, los términos "agente de ataque" y "nanopartícula lipídica que contiene un agente activador" se utilizan indistintamente. En algunas realizaciones, el liposoma terapéutico y el agente de ataque se denominan colectivamente "*dualsoma*". Los dos componentes se pueden almacenar por separado, y el agente de ataque se puede administrar después de la administración del liposoma terapéutico para efectuar un suministro regulado de la carga del liposoma terapéutico. Los métodos de la invención incluyen dos pasos: 1) administración del liposoma terapéutico, y 2) administración del agente de ataque para desencadenar un aumento en la liberación del fármaco desde los liposomas terapéuticos con respecto a la liberación en ausencia del agente de ataque. Los métodos de la invención pueden evitar la liberación temprana de agentes desde el liposoma terapéutico antes de que alcance un sitio diana dentro de un sujeto. Los métodos superan el dilema actual de uso de una preparación liposomal singular para la administración de fármacos, mejorando así la eficacia y la seguridad terapéutica, así como el cumplimiento del paciente.

### 55 II. Definiciones

- Según se utiliza en la presente memoria, los términos "suministro" y "suministrando" se refieren al transporte de un agente terapéutico a un sujeto utilizando los métodos de la invención. El suministro puede estar localizado en una ubicación particular en un sujeto, tal como un tejido, un órgano o células de un tipo concreto.

- 60 Según se utiliza en la presente memoria, el término "agente terapéutico" se refiere a un compuesto o molécula que, cuando está presente en una cantidad eficaz, produce un efecto terapéutico deseado en un sujeto que lo necesite. La presente invención contempla una amplia gama de agentes terapéuticos y su uso junto con las composiciones de liposomas, como se describe adicionalmente en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, en particular un ser humano, en cualquier etapa de vida.

5 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "administrar", "administrado" o "administrando" se refieren a métodos de administración de las composiciones de liposomas de la presente invención. Las composiciones de liposomas de la presente invención se pueden administrar de diversas maneras, incluyendo tópica, parenteral, intravenosa, intradérmica, intramuscular, colónica, rectal o intraperitoneal. Las composiciones de liposomas también se pueden administrar como parte de una composición o formulación.

10 Según se utiliza en la presente memoria, el término "liposoma" abarca cualquier compartimento rodeado por una bicapa lipídica. El término liposoma incluye vesículas unilamelares que comprenden una única bicapa lipídica y generalmente tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 nm. Los liposomas también pueden ser multilamelares, que generalmente tienen un diámetro en el intervalo de 1 a 10  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, los liposomas pueden incluir vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "micela" se refiere a un agregado de moléculas anfífilas, tales como lípidos, ensambladas para formar una partícula con un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo. Las micelas son generalmente conjuntos esféricos con diámetros por debajo de 100 nm, aunque en la técnica se conocen varios diámetros de micelas y formas variables de micelas, tales como micelas discoides.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "agente activador no iónico" se refiere a una sustancia que carece de grupos funcionales cargados, incluyendo grupos funcionales aniónicos y grupos funcionales catiónicos, que al administrarse a un sujeto provoca un aumento en la liberación de la carga de fármaco del liposoma terapéutico de la invención. Los ejemplos de agentes activadores no iónicos incluyen TPGS y estearato de polioxietileno 40.

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término "acumulado" se refiere a los liposomas que se han amontonado en un sitio dado en un sujeto después de la administración, habiendo dejado de circular sistémicamente dentro del sujeto. En algunos casos, la acumulación puede deberse a la unión de un biomarcador específico en el sitio diana a un liposoma que comprende un ligando que reconoce el biomarcador. En algunos casos, la acumulación de liposomas puede deberse a las características de permeabilidad y retención mejoradas de ciertos tejidos, tales como los tejidos cancerosos. La acumulación de liposomas puede evaluarse por cualquier medio adecuado, tal como el análisis compartimental de sujetos de prueba o técnicas no invasivas tales como la tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT), la tomografía por emisión de positrones (PET) o la resonancia magnética nuclear (RMN/RMN). Sin embargo, un experto en la técnica puede planificar el momento de la administración de liposomas a un sujeto concreto para permitir una acumulación suficiente en un sitio diana sin medir directamente la acumulación en el sujeto.

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término "sitio diana" se refiere a una ubicación en la que se desea la acumulación y el suministro de liposomas de un agente activo. En algunos casos, el sitio diana puede ser un tejido o una célula concretos y puede estar asociado con un estado de enfermedad concreto.

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "contacto" se refiere a la interacción de un primer liposoma con un segundo liposoma para desestabilizar el primer liposoma o, de otro modo, efectuar la liberación de los agentes encapsulados del primer liposoma.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "liberación" se refiere al movimiento de un agente activo en un liposoma desde el núcleo del liposoma o la bicapa lipídica al ambiente externo.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "lípidos" se refiere a moléculas lipídicas que pueden incluir grasas, ceras, esteroides, colesterol, vitaminas solubles en grasa, monoglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos, lípidos catiónicos o aniónicos, lípidos derivados y similares, como se describe en detalle a continuación. Los lípidos pueden formar micelas, monocapas y membranas de dos capas. Los lípidos pueden auto-ensamblarse en liposomas.

50 Según se utiliza en la presente memoria, los términos "porcentaje molar" y "% en moles" se refieren al número de moles de un componente lipídico o tensioactivo dado de un liposoma dividido por el número total de moles de todos los componentes lipídicos o tensioactivos. A menos que se indique explícitamente, las cantidades de agentes activos, diluyentes u otros componentes no se incluyen al calcular el % en moles de un componente lipídico o tensioactivo de un liposoma.

55 Según se utiliza en la presente memoria, el término "kit" se refiere a un conjunto de dos o más componentes necesarios para emplear los métodos de la invención. Los componentes del kit pueden incluir, pero no se limitan a,

liposomas de la presente invención, reactivos, tampones, recipientes y/o equipos.

Según se utiliza en la presente memoria, la frase "almacenado por separado" se refiere a una manera de almacenamiento de liposomas que evita que una primera población de liposomas se ponga en contacto con otra población de liposomas.

### III. Realizaciones de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para administrar un agente terapéutico a un sujeto. El método incluye: a) administrar al sujeto un liposoma que comprende un agente terapéutico; y b) administrar al sujeto una nanopartícula lipídica que comprende un agente activador no iónico; con lo que la liberación del agente terapéutico del liposoma después de la administración del agente activador se incrementa en comparación con la liberación del agente terapéutico del liposoma sin la administración del agente activador. El liposoma que comprende un agente terapéutico se denomina "liposoma terapéutico".

Los liposomas de la presente invención comprenden un compartimento acuoso rodeado de al menos una bicapa lipídica. Cuando los lípidos que incluyen un grupo de cabeza hidrófila se dispersan en agua, pueden formar espontáneamente membranas de dos capas denominadas lamelas. Las lamelas están compuestas de dos lamelas monocapa de moléculas de lípidos con sus superficies no polares (hidrófobas) enfrentadas entre sí y sus superficies polares (hidrófilas) enfrentadas al medio acuoso. El término liposoma incluye vesículas unilamelares que comprenden una única bicapa lipídica y generalmente tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 400 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 nm, o de aproximadamente 100 a 200 nm. Los liposomas también pueden ser multilamelares, que generalmente tienen un diámetro en el intervalo de 1 a 10  $\mu\text{m}$ , con dos a cientos de bicapas lipídicas concéntricas que se alternan con capas de una fase acuosa. En algunas realizaciones, los liposomas pueden incluir vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV). Los lípidos del liposoma pueden ser catiónicos, zwitteriónicos, neutros o aniónicos, o cualquier mezcla de los mismos.

La nanopartícula lipídica constituye el "agente de ataque" en los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica se selecciona entre un liposoma, una micela o mezclas de los mismos. La nanopartícula contiene un agente activador no iónico, que puede ser un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de agentes no tensioactivos adecuados para uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, alquilfenol etoxilado, un éster graso etoxilado, un derivado de sorbitán, un derivado de tocoferol, y similares.

La administración del agente de ataque a un sujeto puede ocurrir en cualquier momento suficiente para aumentar la liberación del agente terapéutico del liposoma terapéutico. En algunas realizaciones, el agente de ataque se administra al sujeto después de la administración del liposoma terapéutico. La administración del agente de ataque puede ocurrir, por ejemplo, unos pocos minutos o varias horas después de la administración del liposoma terapéutico. En algunas realizaciones, el agente de ataque se administra al sujeto después de que el liposoma terapéutico se haya acumulado en un sitio diana deseado dentro del sujeto (típicamente en el plazo de aproximadamente 72 horas después de la administración). La acumulación de liposomas en un sitio diana se puede evaluar por cualquier medio adecuado, tal como el análisis compartimental de sujetos de prueba o técnicas no invasivas tales como la tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), la tomografía por emisión de positrones (PET) o la resonancia magnética nuclear (RMN/MRI). Los agentes de diagnóstico como se describen a continuación, por ejemplo, pueden elegirse para su incorporación en los liposomas terapéuticos para la evaluación de la acumulación de liposomas. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que la administración a un sujeto concreto puede cronometrarse para permitir una acumulación suficiente de liposomas terapéuticos en un sitio diana sin medir directamente la acumulación en el sujeto.

En algunas realizaciones, la liberación del agente terapéutico se induce después del contacto del liposoma terapéutico con el agente de ataque. La cantidad de agente terapéutico liberado desde el liposoma puede aumentar en cualquier cantidad con la administración del agente de ataque en comparación con la ausencia del agente de ataque. En algunas realizaciones, la administración del agente de ataque provoca al menos un aumento de 3 veces de la liberación del agente terapéutico del liposoma, en comparación con la administración del liposoma sin el agente de ataque. En algunas realizaciones, la administración del agente de ataque provoca al menos un aumento de 10 veces de la liberación del agente terapéutico desde el liposoma, en comparación con la administración del liposoma sin el agente de ataque. En algunas realizaciones, la administración del agente de ataque provoca al menos un aumento de 25 veces de la liberación del agente terapéutico desde el liposoma, en comparación con la administración del liposoma sin el agente de ataque.

En la presente invención, el sujeto puede ser cualquier mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el liposoma y la nanopartícula lipídica se administran mediante inyección intraperitoneal. Un experto en la técnica apreciará que pueden ser otros modos de administración útiles en la presente invención.

**Liposomas y nanopartículas lipídicas**

Los liposomas y las nanopartículas lipídicas de la presente invención pueden contener cualquier lípido adecuado, incluyendo lípidos catiónicos, lípidos zwitteriónicos, lípidos neutros o lípidos aniónicos como se describió anteriormente. Los lípidos adecuados pueden incluir grasas, ceras, esteroides, colesterol, vitaminas liposolubles, monoglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos, lípidos catiónicos o aniónicos, lípidos derivatizados y similares.

Los fosfolípidos adecuados incluyen, entre otros, fosfatidilcolina (PC), ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI), dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), distearoil fosfatidil colina (DSPC), dioleoil fosfatidil colina (DOPC), dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG), distearoil fosfatidil glicerol (DSPG), dioleoil fosfatidil glicerol (DOPG), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG), dimiristoil fosfatidil serina (DMPS), distearoil fosfatidil serina (DSPS), dioleoil fosfatidil serina (DOPS), dipalmitoil fosfatidil serina (DPPS), dioleoil fosfatidil etanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil- fosfatidiletanolamina (POPE) y dioleoil- fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), 1,2-dielaidoil-sn-glicero-3-fofoetanolamina (transDOPE), y cardiolipina. Los extractos de lípidos, tales como PC de huevo, extracto de corazón, extracto de cerebro, extracto de hígado y PC de soja, también son útiles en la presente invención. En algunas realizaciones, la PC de soja puede incluir PC Hydro Soy (HSPC). En ciertas realizaciones, los lípidos pueden incluir lípidos derivatizados, tales como lípidos PEGilados. Los lípidos derivatizados pueden incluir, por ejemplo, DSPE-PEG2000, colesterol-PEG2000, DSPE-poliglicerol u otros derivados generalmente conocidos en la técnica.

Los liposomas y las nanopartículas lipídicas de la presente invención pueden contener esteroides, caracterizados por la presencia de un sistema anular de gonano tetracíclico fusionado. Los ejemplos de esteroides incluyen, entre otros, colesterol, ácido cólico, progesterona, cortisona, aldosterona, estradiol, testosterona, dehidroepiandrosterona. Los esteroides sintéticos y sus derivados también se contemplan para uso en la presente invención.

Los lípidos catiónicos contienen grupos funcionales cargados positivamente en condiciones fisiológicas. Los lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N-[1-(2,3,-ditetradeciloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE), bromuro de N-[1-(2,3,dioleiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DORIE), 3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil]colesterol (DC-Chol), dimetil dioctadecilamonio (DDAB) y N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA) .

En algunas realizaciones, el liposoma terapéutico incluye uno o más lípidos que pueden ser un fosfolípido, un esteroide y/o un lípido catiónico. En algunas realizaciones, el fosfolípido es una fosfatidilcolina, un fosfatidilglicerol, una fosfatidiletanolamina, una fosfatidilserina, un fosfatidilinositol o un ácido fosfatídico. En algunas realizaciones, la fosfatidilcolina es DSPC. En algunas realizaciones, el fosfatidilglicerol es DSPG. En algunas realizaciones, la fosfatidiletanolamina es DSPE-PEG (2000). En algunas realizaciones, el esteroide es colesterol.

Como se describió anteriormente, la nanopartícula lipídica que constituye el "agente de ataque" se selecciona del grupo que consiste en un segundo liposoma, una micela o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la nanopartícula lipídica es un segundo liposoma. El segundo liposoma se conoce como "liposoma de ataque". En algunas realizaciones, el liposoma de ataque comprende uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en un fosfolípido, un esteroide y un lípido catiónico. En algunas realizaciones, el fosfolípido es una fosfatidilglicerina, una fosfatidilglicerina, una fosfatidilserina, un fosfatidilinositol o un ácido fosfatídico. En algunas realizaciones, la fosfatidilcolina es DPPC. En algunas realizaciones, el esteroide es colesterol. En algunas realizaciones, el lípido catiónico es DOTAP. En algunas realizaciones, el agente activador no iónico es TPGS.

Se puede utilizar cualquier combinación adecuada de lípidos para proporcionar los liposomas y las nanopartículas lipídicas de la invención. Las composiciones lipídicas se pueden adaptar para afectar a características tales como tasas de permeabilidad, estabilidad, tamaño de partícula, potencial zeta, unión a proteínas, circulación *in vivo*, y/o acumulación en tejidos u órganos. Por ejemplo, se puede utilizar DSPC y/o colesterol para disminuir la permeabilidad de los liposomas. Se pueden incluir lípidos negativos o positivos, tales como DSPG y/o DOTAP, para afectar la carga superficial de un liposoma o nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, las composiciones lipídicas pueden incluir aproximadamente diez o menos tipos de lípidos, o aproximadamente cinco o menos tipos de lípidos, o aproximadamente tres o menos tipos de lípidos. En algunas realizaciones, el porcentaje molar (% en moles) de un tipo específico de lípido presente típicamente comprende de aproximadamente 0% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 90% a 100% del total de lípidos presentes en un liposoma o nanopartícula lipídica. En algunas

realizaciones, el liposoma terapéutico comprende 40-80% en moles de DSPC, 5-50% en moles de colesterol, 0-30% en moles de DSPG y 0-10% en moles de DSPE-PEG (2000). En algunas realizaciones, el liposoma de ataque comprende 40-70% en moles de DPPC, 5-20% en moles de colesterol, 0-20% en moles de DOTAP y 20-40% en moles de TPGS.

Las nanopartículas lipídicas de la invención pueden contener tensioactivos que incluyen tensioactivos no iónicos, algunos de los cuales pueden actuar como agentes activadores para facilitar la liberación de la carga del liposoma terapéutico. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen, pero no se limitan a, alquilfenoles etoxilados, ésteres grasos etoxilados, derivados de sorbitán y derivados de tocoferol. Los tensioactivos contemplados para su uso en la presente invención incluyen el succinato de D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol (TPGS), que está disponible con diferentes tamaños de polietilenglicol. En algunas realizaciones, el intervalo de peso molecular para el polietilenglicol en el TPGS es 400-5000. En aún otras realizaciones, el intervalo de peso molecular para el polietilenglicol en el TPGS es 800-2000. En otras realizaciones más, el intervalo de peso molecular para el polietilenglicol en el TPGS es 800-1500. Un TPGS particularmente útil es TPGS(1000), en el cual el peso molecular total del succinato de D- $\alpha$ -tocoferol polietilenglicol es aproximadamente 1543. Según se utiliza en la presente memoria, el término "TPGS" se refiere a TPGS(1000) a menos que se proporcione un tamaño/peso diferente. Otros tensioactivos no iónicos útiles incluyen: p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter de polietilenglicol, isooctilfenil éter de polioxietileno (2), dinonilfenil éter polioxietileno (150), 2,3-dihidroxipropil éster de ácido dodecanoico, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán, monoestearato de polioxietileno (20) sorbitán, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán, y similares. Los agentes activadores de la invención se mencionan en las reivindicaciones.

Un experto en la técnica reconocerá que las composiciones lipídicas pueden ajustarse para modular las propiedades de liberación u otras características de los liposomas según se requiera por una aplicación dada.

### **Agentes terapéuticos**

Los liposomas terapéuticos de la presente invención comprenden uno o más agentes terapéuticos presentes en cualquier lugar, sobre o alrededor del nanoportador. Por ejemplo, un agente terapéutico puede estar incluido en la bicapa lipídica del liposoma, encapsulado en el núcleo acuoso del liposoma, o fijado al exterior del liposoma. El agente o agentes terapéuticos utilizados en la presente invención pueden incluir cualquier agente dirigido a tratar una afección en un sujeto. En general, se puede utilizar cualquier agente terapéutico conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, los agentes enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos (U.S.P.), Goodman & Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª edición, McGraw Hill, 2001; Katzung, Ed., *Basic and Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill/Appleton & Lange, 8ª ed., 21 de septiembre de 2000; *Physician's Desk Reference* (Thomson Publishing; y/o *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 18ª ed., 2006, Beers and Berkow, Eds., Merck Publishing Group; o, en el caso de los animales, *The Merck Veterinary Manual*, 9ª ed., Kahn Ed., Merck Publishing Group, 2005; todos los cuales se incorporan a la presente memoria como referencia.

Los agentes terapéuticos se pueden seleccionar dependiendo el tipo de enfermedad que se desee tratar. Por ejemplo, ciertos tipos de cánceres o tumores, tales como carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma, mieloma y cáncer del sistema nervioso central, así como tumores sólidos y tumores mixtos, pueden implicar la administración de agentes terapéuticos iguales o posiblemente diferentes. En ciertas realizaciones, se puede administrar un agente terapéutico para tratar o afectar una afección cancerosa en un sujeto y puede incluir agentes quimioterapéuticos, tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides, inhibidores de topoisomerasa y otros agentes contra el cáncer. En algunas realizaciones, los agentes pueden incluir agentes antisentido, microARN, ARNip y/o agentes de ARNhc.

Los agentes terapéuticos pueden incluir un agente contra el cáncer o un agente citotóxico incluyendo, pero sin limitarse a, avastina, doxorubicina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo, gemcitabina o taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel. Los agentes anticancerígenos adicionales pueden incluir, entre otros, 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, 4-ipomeanol, 5-etniluracilo, 9-dihidrotaxol, abiraterona, acivicina, aclarrubicina, hidrocloreto de acodazol, acronina, acilfulveno, adecipenol, adozelesina, aldesleucina, antagonistas de all-tk, altretamina, ambamustina, ambomicina, acetato de ametantrona, amidox, amifostina, aminoglutetimida, ácido aminolevulínico, amrubicina, amsacrina, anagrelida, anastrozol, andrografólido, inhibidores de la angiogénesis, antagonista D, antagonista G, antarelix, antramicina, proteína morfogenética-1 antidorsalizante, antiestrógeno, antineoplastón, oligonucleótidos antisentido, glicidato de afidicolina, moduladores del gen de la apoptosis, reguladores de la apoptosis, ácidoapurínico, ARA-CDP-DL-PTBA, arginina desaminasa, asparraginasa, asperlina, asucralina, atamestano, atrimustina, axinastatina 1, axinastatina 2, axinastatina 3, azacitidina, azasetrón, azatocina, azatirosina, azetepa, azotomicina, derivados de baccatina III, balanol, batimastato, benzoclorinas, benzodepa, benzoilstaurosporina, derivados de betalactámicos, beta-aletina, betaclamina B, ácido betulínico, inhibidor de BFGF, bicalutamida, bisantreno, hidrocloreto de bisantreno, bisaziridinilpermina, bisnafida, dimesilato de bisnafida, bistrateno A, bizelesina, bleomicina, sulfato de bleomicina, antagonistas de BCR/ABL, breflato, brequinar sódico, bropirimina, budotitano, busulfán, butionina sulfoximina, cactinomicina, calcipotriol, calfofostina C, calusterona, derivados de camptotecina, IL-2 canarypox, capecitabina, caracemida, carbetímero, carboplatino, carboxamida-

amino-triazol, carboxiamidotriazol, carest M3, carmustina, cam 700, inhibidor derivado del cartílago, hidrocloreto de carrubicina, carzelesina, inhibidores de caseína quinasa, castanospermina, cecrofina B, cedefingol, cetorelix, clorambucilo, clorinas, cloroquinoxalin sulfonamida, cicaprost, cirolemicina, cisplatino, cis-porfirina, cladribina, análogos de clomifeno, clotrimazol, colismicina A, colismicina B, combretastatina A4, análogo de combretastatina, conagenina, crambescidina 816, crisnatol, mesilato de crisnatol, criptoficina 8, derivados de criptoficina A, curacina A, ciclopentantraquinonas, ciclofosfamida, cicloplatam, cipemicina, citarabina, ocfosfato de citarabina, factor citolítico, citostatina, dacarbazina, dacliximab, dactinomicina, hidrocloreto de daunorrubicina, decitabina, deshidrodidemnina B, deslorelinea, dexifosfamida, dexamplatinato, dextrazoxano, dexverapamilo, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diaziquona, didemnina B, didox, dietilnoespermina, dihidro-5-azacitidina, dioxamicina, difenil espiromustina, docetaxel, docosanol, dolasetrón, doxiluridina, doxorubicina, hidrocloreto de doxorubicina, droloxifeno, citrato de droloxifeno, propionato de dromostanolona, dronabinol, duazomicina, duocarmicina SA, ebselen, ecomustina, edatrexato, edelfosina, edrecolomab, eflomitina, hidrocloreto de eflomitina, elemene, elsamitrucina, emitefur, enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, hidrocloreto de epirubicina, epristerida, erbulozol, sistema vector de terapia génica de eritrocitos, hidrocloreto de esorubicina, estramustina, análogo de estramustina, sal de sodio de fosfato de estramustina, agonistas de estrógenos, antagonistas de estrógenos, etanidazol, etopósido, fosfato de etopósido, etoprina, exemestano, fadrozol, hidrocloreto de fadrozol, fazarabina, fenretinida, filgrastim, finasterida, flavopiridol, flezelastina, floxuridina, fluasterona, fludarabina, fosfato de fludarabina, hidrocloreto de fluorodaunorrubicina, fluorouracilo, fluorocitabina, forenimex, formestano, fosquidona, fostriecina, flostriecina sódica, fotemustina, gadolinio texafirina, nitrato de galio, galocitabina, ganirelix, inhibidores de gelatinasa, gemcitabina, hidrocloreto de gemcitabina, inhibidores de glutatión, hepsulfam, heregulina, hexametileno bisacetamida, hidroxiurea, hipericina, ácido ibandrónico, idarrubicina, hidrocloreto de idarrubicina, idoxifeno, idramantona, ilofosfina, ilmofosina, ilomastat, imidazoacridonas, imiquimod, péptidos inmunoestimuladores, inhibidor del receptor del factor-1 de crecimiento de tipo insulínico, agonistas de interferón, interferón alfa-2A, interferón alfa-2B, interferón alfa-N1, interferón alfa-N3, interferón beta-1A, interferón gamma-1B, interferones, interleucinas, iobenguano, yododoxorrubicina, ioplatino, irinotecán, hidrocloreto de irinotecán, iroplact, irsogladina, isobengazol, isohomohalicondrina B, itasetrón, jasplaquinolida, kahalalida F, triacetato de lamelarina-N, lanreótido, acetato de lanreótido, lenograstim, sulfato de lentinano, leptostatina, letrozol, factor inhibidor de leucemia, interferón alfa de leucocitos, acetato de leuprolida, leuprolida/estrógeno/progesterona, leuporelinea, levamisol, liarozol, hidrocloreto de liarozol, análogo de poliamina lineal, péptido disacárido lipófilo, compuestos de platino lipófilos, lisoclinamida 7, lobaplatino, lombricina, lometrexol, lometrexol sódico, lomustina, lonidamina, losoxantrona, hidrocloreto de losoxantrona, lovastatina, loxoribina, lurtotecano, texafirina de lutecio, lisofilina, péptidos líticos, maitansina, manostatina A, marimastat, masoprocol, maspina, inhibidores de matrilisina, inhibidores de metaloproteínasa de la matriz, maitansina, hidrocloreto de mecloretamina, acetato de megestrol, acetato de melengestrol, melfalán, menogaril, merbarona, mercaptopurina, meterelina, metioninasa, metotrexato, metotrexato de sodio, metoclopramida, metoprina, meturedepa, inhibidores de proteína quinasa C de microalgas, inhibidor de MIF, mifeprestona, miltefosina, mirimostim, ARN de doble hebra con emparejamiento erróneo, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitoguazona, mitolactol, mitomalcina, mitomicina, análogos de mitomicina, mitonafida, mitosper, mitotano, factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina, mitoxantrona, hidrocloreto de mitoxantrona, mofaroteno, molgramostim, anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana, monofosforil lípido a pared celular SK de miobacteria, mopidamol, inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos, terapia basada en el supresor-1 de múltiples tumores, agente anticanceroso de mostaza, micaperóxido B, extracto de la pared celular micobacteriana, ácido micofenólico, miriaporona, n-acetildinalina, nafarelinea, nagrestip, naloxona/pentazocina, napavina, nafterpina, nartograstim, nedaplatino, nemorrubicina, ácido neridróico, endopeptidasa neutra, nilutamida, nisamicina, moduladores de óxido nítrico, antioxidante nitróxido, nitruilina, nocodazol, nogalamicina, benzamidas n-sustituidas, 06-benzilguanina, octreotida, oquicenona, oligonucleótidos, onapristona, ondansetrón, oracina, inductor de citocina oral, ormaplatino, osaterona, oxaliplatino, oxaunomicina, oxisurano, paclitaxel, análogos de paclitaxel, derivados de paclitaxel, palauamina, palmitoilrrizoxina, ácido pamidróico, panaxitriol, panomifeno, parabactina, pazeliptina, pegaspargasa, peldesina, peliomicina, pentamustina, pentosano polisulfato sódico, pentostatina, pentozol, sulfato de peplomicina, perflubrón, perfosfamida, alcohol perilítico, fenazinomicina, fenilacetato, inhibidores de fosfatasa, picibanilo, hidrocloreto de pilocarpina, pipobromano, pipsulfano, pirarrubicina, piritrexim, hidrocloreto de piroxantrona, placetina A, placetina B, inhibidor de activador de plasminógeno, complejo de platino, compuestos de platino, complejo de platino-triamina, plicamicina, plomestano, porfímero sódico, porfíromicina, prednimustina, hidrocloreto de procarbazona, propil bis-acridona, prostaglandina J2, antiandrógeno de carcinoma prostático, inhibidores de proteosoma, modulador inmunológico basado en proteína A, inhibidor de proteína quinasa C, inhibidores de proteína tirosina fosfatasas, inhibidores de purina nucleósido fosforilasa, puromicina, hidrocloreto de puromicina, purpurinas, pirazofurina, pirazoloacridina, producto conjugado de polioxietileno-hemoglobina piridoxilada, antagonistas de RAF, raltitrexed, ramosetrón, inhibidores de farnesil proteína transferasa RAS, inhibidores de RAS, inhibidor de RAS-GAP, reteliptina desmetilada, etidronato de renio RE 186, rizoxina, riboprina, ribozimas, retinamida RII, RNAi, roglitimida, rohituquina, romurtida, roquinimex, rubiginona B1, ruboxil, safingol, hidrocloreto de safingol, saintopina, sarcnu, sarcófito A, sargramostim, miméticos de SDI 1, semustina, inhibidor 1 derivado de células senescentes, oligonucleótidos efectores, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la transducción de señales, simtrazeno, proteína de unión a antígeno de cadena sencilla, sizofurano, sobuzoxano, borocaptato sódico, fenilacetato sódico, solverol, proteína de unión a somatomedina, sonermina, esparfosato sódico, ácido esparfósico, esparsomicina, espicamicina D, hidrocloreto de espirogermanio,

espiromustina, espiroplatino, esplenopentina, espongiatina 1, escualamina, inhibidor de células madre, inhibidores de la división de células madre, estipiámina, estreptonigrina, estreptozocina, inhibidores de estromelina, sulfinosina, sulofenur, antagonista de péptido intestinas vasoactivo superactivo, suradista, suramina, swainsonina, glicosaminoglicanos sintéticos, talisomicina, talimustina, metiodida de tamoxifeno, tauromustina, tazaroteno, tecogalán sódico, tegafur, telurapirilio, inhibidores de telomerasa, hidrocloreto de teloxantrona, temoporfina, temozolomida, tenipósido, teroxirona, testolactona, tetraclorodecaoxida, tetrazomina, taliblastina, talidomida, tiamiprina, tiocoralina, tioguanina, tiotepa, trombopoyetina, mimético de trombopoyetina, timalfasina, agonista del receptor de timopoyetina, timotrinano, hormona estimuladora de la tiroides, tiazofurina, etiopurpurina de etilo de estaño, tirapazamina, dicloruro de titanoceno, hidrocloreto de topotecan, topsentina, toremifeno, citrato de toremifeno, factor de células madre totipotentes, inhibidores de la traducción, acetato de trestolona, tretinoína, triacetiluridina, triciribina, fosfato de triciribina, trimetrexato, glucuronato de trimetrexato, triptorelina, tropisetron, hidrocloreto de tubulozol, turosterida, inhibidores de tirosina quinasa, tirfostinas, inhibidores de UBC, ubenimex, mostaza de uracilo, uredepa, factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas del receptor de uroquinasa, vapreotida, variolina B, velaresol, veramina, verdinas, verteporfina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, vindesina, sulfato de vindesina, sulfato de vinepidina, sulfato de vinglicina, sulfato de vinleurosina, vinorelbina, tartrato de vinorelbina, sulfato de vinrosidina, vinxaltina, sulfato de vinzolidina, vitaxina, vorozol, zanoterona, zeniplatino, zilascorb, zinostatina, zinostatina estimalámero, o hidrocloreto de zorrubicina.

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos pueden formar parte de la combinación de agentes que incluye la administración de dos o más agentes terapéuticos. Por ejemplo, se puede administrar un liposoma que tiene tanto cisplatino como oxaliplatino. Además, los agentes terapéuticos se pueden administrar antes, después o con coadyuvantes inmunostimuladores, tales como coadyuvantes de gel de aluminio o sal (p.ej., fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), fosfato de calcio, endotoxinas, coadyuvantes de receptores tipo toll y similares.

Los agentes terapéuticos de la presente invención también pueden incluir radionúclidos para uso en aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, los emisores de electrones Auger, tales como  $^{111}\text{In}$  se pueden combinar con un quelato, tal como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), e incluir en un liposoma para su uso en el tratamiento. Otras combinaciones adecuadas de radionúclidos y/o radionúclidos-quelatos pueden incluir, entre otros, radionúclidos beta ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{89/90}\text{Y}$ ) con DOTA,  $^{64}\text{Cu}$ -TETA,  $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-IDA}$ ;  $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{triaminas}$  (cíclicas o lineales),  $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-Enpy2}$ , y  $^{188/186}\text{Re}(\text{CO})_3\text{-DTPA}$ .

En algunas realizaciones de la presente invención, el agente terapéutico puede ser cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, gemcitabina, 5-fluorouracilo, doxorubicina y un taxano. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es cisplatino u oxaliplatino.

La carga de los agentes terapéuticos se puede llevar a cabo a través de una variedad de formas conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las siguientes referencias: Villiers, M. M. et al., Eds., *Nanotechnology in Drug Delivery*, Springer (2009); Gregoriadis, G., Ed., *Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes*, CRC Press (2006). En algunas realizaciones, se pueden cargar en liposomas uno o más agentes terapéuticos. La carga de liposomas se puede llevar a cabo, por ejemplo, de forma activa o pasiva. Por ejemplo, se puede incluir un agente terapéutico durante el procedimiento de autoensamblaje de los liposomas en una solución, de manera que el agente terapéutico esté encapsulado dentro del liposoma. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico también puede estar incluido en la bicapa de liposomas o dentro de múltiples capas de liposomas multilamelares. En realizaciones alternativas, el agente terapéutico puede cargarse activamente en liposomas. Por ejemplo, los liposomas se pueden exponer a condiciones, tales como la electroporación, en las que la membrana de bicapa se hace permeable a una solución que contiene un agente terapéutico, lo que permite que el agente terapéutico entre en el volumen interno de los liposomas.

### Agentes de diagnóstico

Los liposomas terapéuticos de la presente invención también pueden contener agentes de diagnóstico. Un agente de diagnóstico utilizado en la presente invención puede incluir cualquier agente de diagnóstico conocido en la técnica, como se proporciona, por ejemplo, en las siguientes referencias: Armstrong et al., *Diagnostic Imaging*, 5ª edición, Blackwell Publishing (2004); Torchilin, V. P., Ed., *Targeted Delivery of Imaging Agents*, CRC Press (1995); Vallabhajosula, S., *Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*, Springer (2009). Un agente de diagnóstico puede detectarse por una variedad de formas, incluido un agente que proporciona y/o mejora una señal detectable que incluye, pero no se limita a, señales gamma, radioactivas, ecogénicas, ópticas, fluorescentes, absorbentes, magnéticas o tomográficas. Las técnicas para obtener imágenes del agente de diagnóstico pueden incluir, entre otras, tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), imagenología óptica, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada (TC), obtención de imágenes por rayos X, obtención de imágenes por rayos gamma, y similares.

En algunas realizaciones, un agente de diagnóstico puede incluir quelantes que se unen a iones metálicos que se deben utilizar para una variedad de técnicas de diagnóstico por imagen. Los quelantes ilustrativos incluyen, entre

otros, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido [4-(1,4,8,11-tetraazaciclodec-1-il)metil]benzoico (CPTA), ácido ciclohexanodiaminotetraacético (CDTA), ácido etilenbis(oxietilenonitrilo)tetraacético (EGTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido cítrico, ácido hidroxietil etilendiamino triacético (HEDTA), ácido iminodiacético (IDA), ácido trietilen tetraamino hexaacético (TTHA), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra(metilenfosfónico) (DOTP), 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) y sus derivados.

Un radioisótopo se puede incorporar a algunos de los agentes de diagnóstico descritos en la presente memoria y puede incluir radionúclidos que emiten rayos gamma, positrones, partículas beta y alfa y rayos X. Los radionúclidos adecuados incluyen, pero no se limitan a,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{128}\text{Ba}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{109}\text{Cd}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{130}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{88}\text{Y}$  y  $^{90}\text{Y}$ . En ciertas realizaciones, los agentes radiactivos pueden incluir  $^{111}\text{I}$ -DTPA,  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -DTPA,  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -ENPy2,  $^{62/64/67}\text{Cu}$ -TETA,  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -IDA, y  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ triaminas (cíclicas o lineales). En otras realizaciones, los agentes pueden incluir DOTA y sus diversos análogos con  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{88/90}\text{Y}$ ,  $^{62/64/67}\text{Cu}$ , o  $^{67/68}\text{Ga}$ . En algunas realizaciones, los liposomas pueden ser radiomarcados, por ejemplo, por incorporación de lípidos unidos a quelatos, tales como el DTPA-lípido, como se proporciona en las siguientes referencias: Phillips et al., Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 1(1): 69-83 (2008); Torchilin, V.P. y Weissig, V., Eds. Liposomes 2ª Ed.: Oxford Univ. Press (2003); Elbayoumi, T.A. y Torchilin, V.P., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 33:1196-1205 (2006); Mougin-Degraef, M. et al., Int'l J. Pharmaceutics 344:110-117 (2007).

En otras realizaciones, los agentes de diagnóstico pueden incluir agentes ópticos tales como agentes fluorescentes, agentes fosforescentes, agentes quimioluminiscentes y similares. Numerosos agentes (p.ej., tintes, sondas, etiquetas o indicadores) son conocidos en la técnica y pueden utilizarse en la presente invención. (Véase, p.ej., Invitrogen, The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Décima edición (2005)). Los agentes fluorescentes pueden incluir una variedad de pequeñas moléculas orgánicas y/o inorgánicas o una variedad de proteínas fluorescentes y derivados de las mismas. Por ejemplo, los agentes fluorescentes pueden incluir, pero no se limitan a, cianinas, ftalocianinas, porfirinas, indocianinas, rodaminas, fenoxazinas, fenilxantenos, fenotiazinas, fenoselenazinas, fluoresceínas, benzoporfirinas, escuarinaínas, dipirrolopirimidonas, tetracenos, quinolinas, pirazinas, corrinas, croconios, acridonas, fenantridinas, rodaminas, acridinas, antraquinonas, análogos de calcofenolpirilio, clorinas, naftalocianinas, tintes de metino, tintes de indolenio, compuestos azoicos, azulenos, azaazulenos, colorantes de trifenil metano, indoles, benzoindoles, indocarbocianinas, benzoindocarbocianinas, y derivados de BODIPY™ que tienen la estructura general de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno, y/o productos conjugados y/o derivados de cualquiera de estos. Otros agentes que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, fluoresceína, productos conjugados de fluoresceína-ácido poliaspártico, productos conjugados de fluoresceína-ácido poliglutámico, productos conjugados de fluoresceína-poliarginina, verde de indocianina, productos conjugados de indocianina-ácido dodecaaspártico, productos conjugados de indocianina-ácido poliaspártico, azul de isosulfán, disulfonatos de indol, disulfonato de benzoindol, bis(etilcarboximetil)indocianina, bis(pentilcarboximetil)indocianina, sulfonatos de polihidroxiindol, sulfonato de polihidroxibenzoindol, sulfonato de indol heteroatómico rígido, ácido indocianinobispropanoico, ácido indocianinobishexanoico, 3,6-diciano-2,5-[(N,N,N',N'-tetrakis(carboximetil)amino]pirazina, ácido 3,6-[(N,N,N',N'-tetrakis(2-hidroxietil)amino]pirazin-2,5-dicarboxílico, ácido 3,6-bis(N-azatedino)pirazin-2,5-dicarboxílico, ácido 3,6-bis(N-morfolino)pirazin-2,5-dicarboxílico, ácido 3,6-bis(N-piperazin)pirazino-2,5-dicarboxílico, ácido 3,6-bis(N-tiomorfolino)pirazin-2,5-dicarboxílico, S-óxido de ácido 3,6-bis(N-tiomorfolino)pirazin-2,5-dicarboxílico, S,S-dióxido de 2,5-diciano-3,6-bis(N-tiomorfolino)pirazina, tetrasulfonato de indocarbocianina, cloroindocarbocianina, y ácido 3,6-diaminopirazin-2,5-dicarboxílico.

Un experto en la técnica apreciará que los agentes ópticos concretos utilizados pueden depender de la longitud de onda utilizada para la excitación, la profundidad debajo del tejido de la piel y otros factores generalmente bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la absorción óptima o los máximos de excitación para los agentes ópticos pueden variar dependiendo del agente empleado, pero en general, los agentes ópticos de la presente invención absorberán o serán excitados por la luz en el intervalo ultravioleta (UV), visible o infrarrojo (IR) del espectro electromagnético. Para obtener imágenes, se prefieren los colorantes que absorben y emiten en el IR cercano (~700-900 nm, por ejemplo, indocianinas). Para la visualización tópica utilizando un método endoscópico, es adecuado cualquier colorante absorbente en el intervalo visible.

En algunas realizaciones, la longitud de onda de la radiación no ionizante empleada en el procedimiento de la presente invención puede variar de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 1200 nm. En una realización ilustrativa, el agente fluorescente puede ser excitado por la luz que tiene una longitud de onda en el intervalo azul de la porción visible del espectro electromagnético (de aproximadamente 430 nm a aproximadamente 500 nm) y emite a una longitud de onda en el intervalo verde de la porción visible del espectro electromagnético (de aproximadamente 520 nm a aproximadamente 565 nm). Por ejemplo, los colorantes de fluoresceína se pueden excitar con luz con una longitud de onda de aproximadamente 488 nm y tienen una longitud de onda de emisión de aproximadamente 520 nm. En cuanto a otro ejemplo, el ácido 3,6-diaminopirazin-2,5-dicarboxílico se puede excitar con luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 470 nm y presenta fluorescencia a una longitud de onda de aproximadamente 532 nm. En otra realización, las longitudes de onda de excitación y emisión del agente

óptico pueden caer en el intervalo del infrarrojo cercano del espectro electromagnético. Por ejemplo, los tintes de indocianina, tales como el verde de indocianina, se pueden excitar con luz con una longitud de onda de aproximadamente 780 nm y tienen una longitud de onda de emisión de aproximadamente 830 nm.

- 5 En otras realizaciones más, los agentes de diagnóstico pueden incluir, entre otros, resonancia magnética (MR) y agentes de contraste de rayos X que son generalmente bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, agentes de contraste de rayos X a base de yodo, óxido de hierro superparamagnéticos (SPIO), complejos de gadolinio o manganeso, y similares. (Véase, por ejemplo, Armstrong et al., *Diagnostic Imaging*, 5ª edición, Blackwell Publishing (2004)). En algunas realizaciones, un agente de diagnóstico puede incluir un agente de obtención de
- 10 imágenes de resonancia magnética (MR). Los agentes de resonancia magnética ilustrativos incluyen, entre otros, agentes paramagnéticos, agentes superparamagnéticos y similares. Los agentes paramagnéticos ilustrativos pueden incluir, entre otros, ácido gadopentético, ácido gadotérico, gadodiamida, gadolinio, gadoteridol, mangafodipir, gadoversetamida, citrato de amonio férrico, ácido gadobénico, gadobutrol o ácido gadoxético. Los agentes superparamagnéticos pueden incluir, entre otros, óxido de hierro superparamagnético y ferristeno. En ciertas
- 15 realizaciones, los agentes de diagnóstico pueden incluir agentes de contraste de rayos X como se proporciona, por ejemplo, en las siguientes referencias: H.S Thomsen, R.N. Muller y R.F. Mattrey, Eds., *Trends in Contrast Media*, (Berlin: Springer-Verlag, 1999); P. Dawson, D. Cosgrove y R. Grainger, Eds., *Textbook of Contrast Media* (ISIS Medical Media 1999); Torchilin, V.P., *Curr. Pharm. Biotech.* 1:183-215 (2000); Bogdanov, A.A. et al., *Adv. Drug Del. Rev.* 37:279-293 (1999); Sachse, A. et al., *Investigative Radiology* 32(1):44-50 (1997). Los ejemplos de agentes de
- 20 contraste de rayos X incluyen, sin limitación, iopamidol, iomeprol, iohexol, iopentol, iopromida, iosimida, ioversol, iotrolan, iotasul, iodixanol, iodecolol, iodecimol, ioglucomida, iogulaida, iogulamida, iosarcosil, ioxilan, iopamirón, metrizamida, iobitridol e iosimenol. En ciertas realizaciones, los agentes de contraste de rayos X pueden incluir iopamidol, iomeprol, iopromida, iohexol, iopentol, ioversol, iobitridol, iodixanol, iotrolan y iosimenol.
- 25 En cuanto a los agentes terapéuticos descritos anteriormente, los agentes de diagnóstico pueden asociarse con el liposoma terapéutico en una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, incluirse o encapsularse en el liposoma. De manera similar, la carga de los agentes de diagnóstico se puede llevar a cabo a través de una variedad de formas conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las siguientes referencias: Villiers, M. M. et al., Eds., *Nanotechnology in Drug Delivery*, Springer (2009); Gregoriadis, G., Ed., *Liposome Technology: Entrapment of drugs and other materials into liposomes*, CRC Press (2006).
- 30

### Formulación y Administración

- 35 En algunas realizaciones, la presente invención puede incluir una composición de liposomas y un portador fisiológicamente (es decir, farmacéuticamente) aceptable. Según se utiliza en la presente memoria, el término "portador" se refiere a una sustancia típicamente inerte utilizada como diluyente o vehículo para un fármaco tal como un agente terapéutico. El término también abarca una sustancia típicamente inerte que confiere cualidades cohesivas a la composición. Típicamente, los portadores fisiológicamente aceptables están presentes en forma líquida. Los ejemplos de portadores líquidos incluyen solución salina fisiológica, tampón de fosfato, solución salina
- 40 tamponada normal (135-150 mM NaCl), agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, glicoproteínas para proporcionar una estabilidad mejorada (p.ej., albúmina, lipoproteína, globulina, etc.), y similares. Dado que los vehículos fisiológicamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método concreto utilizado para administrar la composición, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (Véase, p.ej., Remington's
- 45 *Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed., 1989).

- Las composiciones de la presente invención se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas o se pueden producir en condiciones estériles. Las soluciones acuosas pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tampones, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán y oleato de
- 50 trietanolamina. También se pueden incluir azúcares para estabilizar las composiciones, tales como un estabilizador para composiciones de liposomas liofilizadas.
- 55

- La composición de liposomas de elección, sola o combinada con otros componentes adecuados, se puede preparar en formulaciones de aerosol (es decir, se pueden "nebulizar") para su administración mediante inhalación. Las formulaciones de aerosol se pueden colocar en propelentes aceptables a presión, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.
- 60

Las formulaciones adecuadas para administración rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que incluyen una cantidad eficaz de una composición de liposomas envasada con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas incluyen triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos parafínicos. Además, también es posible

utilizar cápsulas rectales de gelatina que contienen una combinación de la composición de liposomas de elección con una base, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles e hidrocarburos parafínicos.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones de inyectables estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las soluciones y suspensiones para inyectables también se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. En la práctica de la presente invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, mediante infusión intravenosa, tópicamente, intraperitonealmente, intravesicalmente o intratecalmente. La administración parenteral y la administración intravenosa son los métodos preferidos de administración. Las formulaciones de composiciones de liposomas se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales.

La preparación farmacéutica está preferiblemente en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo, p.ej., una composición de liposoma. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de preparación. La composición puede, si se desea, también contener otros agentes terapéuticos compatibles.

En el uso terapéutico para el tratamiento del cáncer, las composiciones de liposomas que incluyen un agente terapéutico y/o de diagnóstico utilizado en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a la dosis inicial de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg diariamente. Un intervalo de dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, pueden ser utilizados. Sin embargo, las dosis pueden variar dependiendo de los requisitos del paciente, la gravedad de la afección que se esté tratando y la composición de liposomas que se emplee. Por ejemplo, las dosis se pueden determinar empíricamente considerando el tipo y la etapa del cáncer diagnosticado en un paciente concreto. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para influir en una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, la naturaleza y el alcance de los efectos secundarios adversos que acompañan a la administración de una composición de liposoma concreta en un paciente concreto. La determinación de la dosis adecuada para una situación concreta está dentro del conocimiento práctico del facultativo. En general, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son menores que la dosis óptima de la composición del liposoma. Después de eso, la dosis se incrementa en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo en determinadas circunstancias. Por conveniencia, la dosis diaria total se puede dividir y administrar en porciones durante el día, si se desea.

#### **Agentes de direccionamiento**

En algunos casos, la acumulación de liposomas en un sitio diana puede deberse a las características mejoradas de permeabilidad y retención de ciertos tejidos, tales como los tejidos cancerosos. La acumulación de esta manera a menudo resulta en parte debida al tamaño de los liposomas y puede que no requiera una funcionalidad de direccionamiento especial. En otros casos, los liposomas de la presente invención también pueden incluir un agente de direccionamiento. En general, los agentes de direccionamiento de la presente invención pueden asociarse con cualquier diana de interés, tal como una diana asociada a un órgano, tejidos, células, matriz extracelular o región intracelular. En ciertas realizaciones, una diana puede estar asociada a un estado de enfermedad concreto, tal como una afección cancerosa. En algunas realizaciones, el componente de direccionamiento puede ser específico para una sola diana, tal como un receptor. Las dianas adecuadas pueden incluir, entre otros, un ácido nucleico, tal como un ADN, ARN o derivados modificados de los mismos. Las dianas adecuadas también pueden incluir, pero no están limitadas a, una proteína, tal como una proteína extracelular, un receptor, un receptor de la superficie celular, un marcador tumoral, una proteína transmembrana, una enzima o un anticuerpo. Las dianas adecuadas pueden incluir un carbohidrato, como un monosacárido, disacárido o polisacárido que puede estar presente, por ejemplo, en la superficie de una célula.

En ciertas realizaciones, un agente de direccionamiento puede incluir un ligando objetivo (p.ej., un péptido que contiene RGD), una molécula pequeña mimética de un ligando diana (p.ej., un ligando mimético de péptidos), o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para una diana concreta. En algunas realizaciones, un agente de direccionamiento puede incluir adicionalmente derivados de ácido fólico, derivados B-12, péptidos de integrina RGD, derivados de NGR, derivados de somatostatina o péptidos que se unen al receptor de somatostatina, p.ej., octreotido y octreotato, y similares. Los agentes de direccionamiento de la presente invención también pueden incluir un aptámero. Los aptámeros puede diseñarse para asociarse o unirse a una diana de interés. Los aptámeros pueden comprender, por ejemplo, ADN, ARN y/o péptidos, y ciertos aspectos de los aptámeros son bien conocidos

en la técnica. (Véase, p.ej., Klussman, S., Ed., The Aptamer Handbook, Wiley-VCH (2006); Nissenbaum, E.T., Trends in Biotech. 26(8): 442-449 (2008)).

#### Kits para la administración de agentes activos

En otro aspecto, la presente invención también proporciona kits para administrar los liposomas y nanopartículas lipídicas a un sujeto para tratar un estado de enfermedad. En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit para administrar un agente terapéutico a un sujeto, comprendiendo el kit: a) una primera composición que comprende un liposoma que contiene un agente terapéutico; y b) una segunda composición que comprende una nanopartícula lipídica que contiene un agente activador no iónico; en donde la primera y segunda composiciones se almacenan por separado antes de su administración al sujeto.

Tales kits incluyen típicamente dos o más componentes necesarios para tratar un estado de enfermedad, tal como una afección cancerosa. Los componentes pueden incluir las composiciones lipídicas de la presente invención, reactivos, tampones, recipientes y/o equipos. Los liposomas y las nanopartículas lipídicas pueden estar en forma liofilizada y a continuación reconstituirse antes de la administración. En ciertas realizaciones, los kits de la presente invención pueden incluir conjuntos de envasado que pueden incluir uno o más componentes utilizados para tratar el estado de enfermedad de un paciente. Por ejemplo, un conjunto de envasado puede incluir recipientes separados que albergan los liposomas terapéuticos y los agentes de ataque como se describe en la presente memoria. Un recipiente separado puede incluir otros excipientes o agentes que pueden mezclarse con las composiciones antes de la administración a un paciente. En algunas realizaciones, un médico puede seleccionar y hacer coincidir ciertos componentes y/o conjuntos de envasado dependiendo del tratamiento o diagnóstico necesario para un paciente concreto.

#### IV. Ejemplos

La práctica de esta invención se ilustra, pero no pretende estar limitada por, los ejemplos en la Tabla A. A través de estos ejemplos, se demuestra claramente *in vitro* que el liposoma de ataque puede utilizarse para activar la liberación de carga de liposomas terapéuticos con características de liberación por lo demás deficientes. En los ejemplos 1, 2 y 11-12, los liposomas terapéuticos contienen agentes citotóxicos que incluyen cisplatino u oxaliplatino. En los Ejemplos 3-10, se utiliza 5-carboxifluoresceína (5-CF) como marcador en composiciones de liposomas terapéuticos. Las características de estas muestras se resumen en la Tabla A a continuación. Los ejemplos 1-5 y 10 muestran que el mismo liposoma de ataque (Parte B) se utiliza para activar y/o mejorar la liberación de una variedad de composiciones terapéuticas de liposomas (Parte A) con o sin funcionalidad encubierta. Los ejemplos 6-9 muestran el papel crítico del agente activador en el liposoma de ataque. La carga superficial del liposoma de ataque es esencialmente neutra en los Ejemplos 8 y 9.

**Tabla A. Ejemplos de liposomas terapéuticos y de ataque**

Ejemplo	Carga encapsulada	Liposoma Terapéutico Parte A	Liposoma de Ataque Parte B
1	Oxaliplatino	NLICOV003F-02-DSPC/DSPG/Col No encubiertos (70/20/10)	4460-075-cargado(+)/TPGS DPPC/Col/TPGS/DOTAP (42/10/32/16)
2	Cisplatino	NLICOV00AR-02-DSPC/DSPG/Col No encubiertos (70/20/10)	4460-075-cargado(+)/TPGS
3	5-CF	4460-090-DSPC/DSPG/Col No encubiertos (48/12/40)	4460-075-cargado(+)/TPGS
4	5-CF	4460-077-DSPC/DSPG/Col No encubiertos (70/20/10)	4460-075-cargado(+)/TPGS
5	5-CF	4386-143-DSPC/Col/DSPE-PEG (2000) encubiertos (55/40/5)	4460-075-cargado(+)/TPGS
6	5-CF	4460-090-No encubierto	4460-084-cargado(+) DPPC/Col/DOTAP (73/11/16)
7	5-CF	4460-077-No encubierto	4460-084-cargado (+)
8	5-CF	4460-090-No encubierto	4384-086-carga(0)/TPGS DPPC/Col/TPGS (60/10/30)
9	5-CF	4460-077-No encubierto	4384-086-carga(0)/TPGS
10	5-CF	4460-090-No encubierto	4460-075-cargado(+)/TPGS

Ejemplo	Carga encapsulada	Liposoma Terapéutico Parte A	Liposoma de Ataque Parte B
11	Oxaliplatino	NLI COV003F-02-No encubierto	4460-104- cargado(+)/TPGS DPPC/Col/TPGS/DOTAP (42/10/32/16)
12	Cisplatino	NLI 4481101-HSPC/Col/DSPE-PEG (2000) Encubierto (55/40/5)	4460-104-cargado(+)/TPGS

### Ejemplo 1

5 Las composiciones de un liposoma terapéutico (NLICOV003F-02) que contiene oxaliplatino y un liposoma de ataque (4460-075 DPPC/Col/DOTAP/TPGS) se muestran en la Tabla 1. El liposoma terapéutico (Northern Lipid Inc.) contenía 2,9 mg/ml de oxaliplatino y 71,8 mg/mL de lípidos totales. El liposoma de ataque fue preparado mediante las siguientes etapas:

- 10 1. Todos los lípidos se pesaron y se colocaron en un matraz de fondo redondo.
2. Se añadió cloroformo/metanol 3:1 (v/v) al matraz para disolver todos los lípidos; la concentración de lípidos fue de aproximadamente el 2,5% en peso.
3. Los disolventes se eliminaron de la mezcla lipídica utilizando un evaporador rotativo a 40°C, y se aplicó vacío a través del evaporador rotativo durante 0,5 horas a 40°C para eliminar los disolventes residuales.
- 15 4. El secado se continuó bajo vacío doméstico durante la noche a temperatura ambiente para eliminar los disolventes traza.
5. Se añadió solución 1X de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (0,0067 M) a la película lipídica seca alrededor del fondo del matraz, y la dispersión se agitó a 70°C durante una hora.
6. La dispersión de lípidos (dispersión de vesículas multilamelares) se extruyó 5 veces a través de una película de policarbonato de 200 nm con doble empaquetamiento a 70°C en una extrusora de 10 ml a una presión de aproximadamente 13,79 bar (200 psi).
- 20 7. La extrusión se continuó 10 veces a través de una película de policarbonato de 100 nm con doble empaquetamiento a 70°C bajo una presión de 20,68 bar (300 psi).
8. La muestra de liposomas extruida se recogió y el tamaño de partícula y el potencial zeta se midieron utilizando un Malvern Zetasizer Nano ZS.

25 La liberación de oxaliplatino *in vitro* a partir de NLICOV003F-02 se realizó en soluciones de PBS 1X (pH = 7,4 y 5,0) mediante la mezcla de una alícuota de liposoma de ataque con el liposoma terapéutico. La primera muestra se recogió inmediatamente (en menos de 3 minutos) a temperatura ambiente y se preparó para medir la liberación de oxaliplatino. La liberación se determinó filtrando las muestras a través de filtros centrífugos Amicon 50K MWCO a 30 16500 rpm durante 5 minutos. El oxaliplatino liberado en la fase acuosa libre de liposomas se analizó mediante ICP-OES. Después de tomar la muestra inmediata, la mezcla se incubó posteriormente a 37°C durante 48 horas. Las muestras se recogieron posteriormente a las 1, 6, 24 y 48 horas para el análisis de la liberación de oxaliplatino. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y 2. Los datos mostrados en la Tabla 2 y representados en la Figura 1 indican que la liberación total de liposomas terapéuticos (NLICOV003F-02) se incrementó de ~5% en el momento cero a 35 ~40% en 6 hr. por la adición de una cantidad igual de liposomas de ataque (4460-075). Los resultados también indican que la liberación total del contenido de los liposomas terapéuticos aumenta con la cantidad de liposomas de ataque en ambas condiciones de pH. El liposoma terapéutico es un liposoma cargado no encubierto que contiene 10% en moles de colesterol. El liposoma de ataque tiene una carga opuesta y contiene 32% en moles de TPGS.

40

**Tabla 1. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	NLI COV003F-02	DSPC/DSPG/Col = 70/20/10	83,6	-22,6
Liposoma de ataque	4460-075	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	80,3	11,4

**Tabla 2. Liberación in vitro de dualsoma en PBS 1X (pH = 7,4 y pH = 5,0)**

Liposoma Terapéutico (NLICOV00AR-02) Cantidad (mL)	Liposoma de Ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	4,5	Oxaliplatino	3,74%	4,17%	4,32%	4,58%	4,53%
0,5	0,1	4,4	Oxaliplatino	14,76%	26,17%	28,46%	32,52%	21,38%
0,5	0,2	4,3	Oxaliplatino	18,61%	33,07%	36,55%	26,48%	22,33%
0,5	0,5	4,0	Oxaliplatino	24,69%	42,65%	43,21%	29,22%	24,33%
Liposoma Terapéutico (NLICOV00AR-02) Cantidad (mL)	Liposoma de Ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 5X (pH = 5,0) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	4,5	Oxaliplatino	3,90%	4,37%	4,54%	4,82%	5,14%
0,5	0,1	4,4	Oxaliplatino	15,46%	26,44%	28,95%	28,86%	21,47%
0,5	0,2	4,3	Oxaliplatino	21,11%	34,39%	37,16%	28,30%	24,74%
0,5	0,5	4,0	Oxaliplatino	26,06%	41,75%	45,62%	30,94%	28,13%

**Ejemplo 2**

5 Este ejemplo ilustra el cisplatino mejorado de los liposomas terapéuticos después de añadir diferentes cantidades del liposoma de ataque. Los liposomas terapéuticos que contenían 2,5 mg/ml de cisplatino y 77,5 mg/ml de lípidos totales (NLICOV00AR-02, Northern Lipids Inc.) se prepararon mediante un procedimiento de carga pasiva. El liposoma de ataque que consistía en DPPC, colesterol, DOTAP y TPGS (4460-075) se preparó como se describe en el Ejemplo 1.

15 La liberación de cisplatino *in vitro* desde NLICOV00AR-02 se realizó en soluciones de PBS 1X (pH = 7,4 y 5,0) añadiendo alícuotas de liposoma de ataque (4460-075) al liposoma terapéutico. Las muestras se recogieron inmediatamente a temperatura ambiente, y a 1, 6, 24 y 48 horas después de la incubación a 37°C. Las muestras se filtraron a través de filtros centrifugos Amicon 50K MWCO a 16500 rpm durante 5 minutos. El cisplatino liberado en la fase acuosa libre de liposomas se analizó mediante ICP-OES. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y 4. Los datos mostrados en la Tabla 4 se representaron gráficamente y se muestran en la Figura 2. Los resultados indican que la liberación total de liposomas terapéuticos (NLICOV00AR-02) a las 48 horas se incrementó de ~1% sin liposoma de ataque a ~27% con una cantidad igual de liposomas de ataque. Los resultados también indican que la liberación total de liposomas terapéuticos aumentó a medida que la cantidad de liposomas de ataque aumentó en ambas condiciones de pH. En este ejemplo, el liposoma terapéutico era un liposoma cargado, no encubierto, que contenía 10% en moles de colesterol. El liposoma de ataque tenía carga opuesta y contenía 32% en moles de TPGS.

25

**Tabla 3. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	NLI COV00AR-02	DSPC/DSPG/Col = 70/20/10	96,3	-22,4
Liposoma de ataque	4460-075	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	80,3	11,4

**Tabla 4. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS IX (pH = 7,4 y pH = 5,0)**

Liposoma terapéutico (NLICOV00AR-02) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	4,5	Cisplatino	0,97%	1,05%	1,05%	1,13%	1,11%
0,5	0,1	4,4	Cisplatino	4,90%	7,84%	9,25%	10,65%	11,88%
0,5	0,2	4,3	Cisplatino	5,68%	10,63%	12,47%	15,45%	17,55%
0,5	0,5	4,0	Cisplatino	7,20%	14,60%	17,62%	21,84%	26,73%
Liposoma terapéutico (NLICOV00AR-02) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 5X (pH = 5,0) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	4,5	Cisplatino	1,01%	1,02%	1,05%	1,16%	1,20%
0,5	0,1	4,4	Cisplatino	5,65%	7,88%	9,25%	11,66%	13,96%

**Ejemplo 3**

5 En este ejemplo, el liposoma de ataque (Parte B, 4460-075) consistía en DPPC, colesterol, DOTAP y TPGS como se muestra en la Tabla 5; el método de preparación fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 1. El liposoma terapéutico (Parte A, 4460-090) contenía 5-carboxifluoresceína (5-CF) como marcador. El liposoma que contenía 5-CF se preparó mediante el procedimiento de carga pasiva como se describe a continuación:

- 10 1. Los componentes lipídicos se pesaron y se colocaron en un matraz de fondo redondo.
2. Se añadió cloroformo/metanol 3:1 (v/v) para disolver todos los lípidos; La concentración fue de aproximadamente el 2,5% en peso.
3. Los disolventes se eliminaron de la mezcla lipídica utilizando un evaporador rotativo a 40°C, y se aplicó vacío a través del evaporador rotativo durante 0,5 horas a 40°C para eliminar los disolventes residuales.
- 15 4. El secado se continuó utilizando el vacío doméstico durante la noche a temperatura ambiente para eliminar los disolventes traza.
5. Se añadió solución 1X de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (0,0067 M) a la película lipídica seca alrededor del fondo del matraz, y la dispersión resultante se agitó a 70°C durante una hora. En esta etapa, se añadió 5-carboxifluoresceína (5-CF) a PBS a una concentración de 2,0 mg/ml. El valor de pH de la dispersión se ajustó a 7,1.
- 20 6. La dispersión de la vesícula lipídica se extruyó 5 veces a través de una película de policarbonato de 200 nm con doble empaquetamiento a 70°C con una extrusora de 10 ml a una presión de aproximadamente 13,79 bar (200 psi).
7. La extrusión se continuó 10 veces a través de una película de policarbonato de 100 nm con doble empaquetamiento a 70°C bajo una presión de 20,68 bar (300 psi).
- 25 8. La preparación final de los liposomas se inyectó en un casete de 3,0-12,0 ml de MWCO 20.000 para diálisis.
9. La preparación del liposoma se dializó frente a 1000 ml de solución de PBS 1X durante 24 horas.
10. La diálisis se repitió dos veces más con 1000 ml de tampón de PBS 1X de nueva aportación.
- 30 11. Los liposomas dializados se recogieron y el tamaño de partícula y el potencial zeta se midieron utilizando un Malvern Zetasizer Nano ZS.

La Parte A del liposoma se mezcló con la Parte B y se determinó la liberación de 5-CF a la fase acuosa libre de liposomas mediante una HPLC Agilent 1200 con un Detector de fluorescencia Waters 2475 de longitud de onda múltiple (S/N 608975406M). La columna era una columna BDS Hypersil C18 (150 mmX3,0 µm, Thermo Scientific, S/N: 0908389T, Núm. de Lote 10770). La fase móvil consistió en 5% (peso) de IPA/5% (peso) de ACN/90% (peso) de agua con acetato de amonio 50 mM. No se aplicó gradiente. El caudal fue de 0,8 ml/min a 40°C. El volumen de inyección fue de 5,0 µL. El tiempo de ejecución se estableció en 5 minutos, y el CF-5 se eluyó a ~1,0 min. Para la detección de fluorescencia, se utilizaron una longitud de onda de excitación de 492 nm y una longitud de onda de emisión de 514 nm. La EUFS se estableció en 50.000 y la ganancia se estableció en 1,0 en el detector. Se utilizaron

patrones externos de CF-5 en PBS IX para la calibración. El intervalo de calibración lineal fue de 0,05 µg/mL a 2,0 µg/mL, dando como resultado un valor  $R^2$  mayor que 0,99.

Los resultados mostrados en la Tabla 6 y representados en la Figura 3 indican que la liberación total de liposomas terapéuticos (4460-090) a las 48 horas aumentó de aproximadamente 4% a aproximadamente 16% mediante la adición de una cantidad igual de liposomas de ataque (4460-075) en PBS 1X a pH 7,4. Los resultados también sugieren que la liberación de liposomas terapéuticos aumentó con la cantidad inicial creciente de liposomas de ataque. En este ejemplo, la Parte A del liposoma era un liposoma cargado no encubierto que contenía 40% en moles de colesterol. El liposoma de ataque, Parte B, tenía carga opuesta y contenía TPGS.

**Tabla 5. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4460-090	DSPC/DSPG/Col = 48/12/40	109,2	-17,4
Liposoma de ataque	4460-075	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	80,3	11,4

**Tabla 6. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 7,4)**

Liposoma terapéutico (4460-090) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	9,5	5-CF	0,60%	0,85%	1,50%	2,98%	4,07%
0,5	0,1	9,4	5-CF	5,78%	5,87%	7,23%	8,92%	8,08%
0,5	0,5	4,0	5-CF	8,25%	15,56%	18,04%	17,66%	16,33%

#### **Ejemplo 4**

En este ejemplo, la Parte A (4460-077) del liposoma terapéutico contenía 5-CF (5-carboxifluoresceína) como marcador, y la composición lipídica era la misma que la composición terapéutica del liposoma en los Ejemplos 1 y 2. La composición del liposoma de ataque, Parte B, fue la misma que en los Ejemplos 1 y 2 (véase la Tabla 7).

Los resultados mostrados en la Tabla 8 y representados en la Figura 4 indican que la liberación total de 5-CF desde la Parte A (4460-077) del liposoma a las 48 horas aumentó de ~5% a ~32% después de añadir una cantidad igual de la Parte B (4460-075) del liposoma de ataque en PBS 1X a pH 7,4. Los resultados también muestran que la liberación de 5-CF desde la Parte A del liposoma aumentó a medida que aumentaba la cantidad inicial de la Parte B del liposoma. Estos resultados concuerdan con el hallazgo descrito en los Ejemplos 1 y 2. En este ejemplo, la Parte A del liposoma era un liposoma cargado no encubierto y que contenía 10% en moles de colesterol. La Parte B del liposoma de ataque tenía carga opuesta y contenía TPGS.

**Tabla 7. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4460-077	DSPC/DSPG/Col = 70/20/10	88,1	-20,5
Liposoma de ataque	4460-075	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	80,3	11,4

**Tabla 8. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 7,4)**

Liposoma terapéutico (4460-077) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	9,5	5-CF	2,69%	3,04%	3,42%	4,25%	5,34%
0,5	0,1	9,4	5-CF	16,58%	24,75%	26,48%	30,84%	29,36%
0,5	0,5	4,0	5-CF	13,08%	24,96%	26,08%	30,36%	32,48%

**Ejemplo 5**

5 En este ejemplo, la Parte A (4386-143) del liposoma se cargó con 5-carboxifluoresceína (5-CF) en la fase acuosa interior como en los Ejemplos 3 y 4. Las composiciones de la Parte A y B (4460-075) del liposoma se proporcionan en la Tabla 9.

10 Los resultados mostrados en la Tabla 10 y representados en la Figura 5 indican que la liberación total de 5-CF desde la Parte A (4386-143) del liposoma a las 48 horas aumentó del ~2% a ~20% mediante la adición de una cantidad igual de la Parte B (4460-075) del liposoma de ataque en PBS IX a pH 7,4. Los resultados también muestran que la liberación de la Parte A del liposoma aumentó a medida que aumentaba la cantidad inicial de la Parte B del liposoma de ataque. En este ejemplo, el liposoma terapéutico era un liposoma encubierto que contenía 40% en moles de colesterol. El liposoma de ataque tenía carga opuesta y contenía TPGS.

15

**Tabla 9. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4386-143	DSPC/Col/DSPE-PEG (2000) = 55/40/5	91,1	-0,87
Liposoma de ataque	4460-075	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	80,3	11,4

**Tabla 10. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS IX (pH = 7,4)**

Liposoma terapéutico (4386-143) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas	Liberación Inmediata después de mezclar
0,5	0,0	9,5	5-CF	0,92%	1,10%	1,07%	1,58%	2,04%
0,5	0,1	9,4	5-CF	5,40%	8,32%	10,26%	13,52%	13,25%
0,5	0,5	4,0	5-CF	9,50%	12,82%	18,30%	20,80%	19,72%

**Ejemplo 6**

20 En este ejemplo, las composiciones de los liposomas Parte A y B se muestran en la Tabla 11. El liposoma terapéutico Parte A (4460-090) contenía 5-CF. Cabe señalar que el liposoma de ataque, Parte B (4460-084), no incluyó el agente activador TPGS en la composición. Los resultados mostrados en la Tabla 12 y representados en la Figura 6 indican que la liberación total de la Parte A (4460-090) del liposoma no se vio afectada por la adición de la Parte B (4460-084) del liposoma en PBS 1X a pH 7,4. En este ejemplo, el liposoma terapéutico era un liposoma no encubierto que contenía 40% en moles de colesterol. El liposoma de ataque tenía carga opuesta pero no incluía TPGS.

30 Este ejemplo ilustra claramente la necesidad de un agente activador como TPGS en la composición de liposomas de ataque para desencadenar la liberación de la Parte A del liposoma. Sin TPGS, esencialmente, no se observó una liberación mejorada como se muestra en este ejemplo.

**Tabla 11. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4460-090	DSPC/DSPG/Col = 48/12/40	109,2	-17,4
Liposoma de ataque	4460-084	DPPC/Col/DOTAP = 73/11/16	91,56	23,0

**Tabla 12. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 7,4)**

Liposoma terapéutico (4460-090) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-084) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	9,5	5-CF	0,60%	0,85%	1,50%	2,98%	4,07%
0,5	0,1	9,4	5-CF	0,60%	1,51%	2,08%	3,34%	4,67%
0,5	0,5	4,0	5-CF	0,83%	1,60%	2,45%	4,45%	4,19%

**5 Ejemplo 7**

En este ejemplo, las composiciones de la Parte A y B del liposoma se muestran en la Tabla 13. La Parte A (4460-077) del liposoma terapéutico contenía 5-CF. Cabe señalar que el liposoma de ataque, Parte B (4460-084), no contenía el agente activador TPGS en la composición. Los resultados mostrados en la Tabla 14 y representados en la Figura 7 indican que la liberación total de la Parte A (4460-077) del liposoma no se vio afectada por la adición de la Parte B (4460-084) del liposoma de ataque en PBS 1X a pH 7,4. En este ejemplo, el liposoma terapéutico era un liposoma no encubierto que contenía 10% en moles de colesterol. El liposoma de ataque tenía carga opuesta pero sin TPGS. Sin TPGS en la Parte B, no se observó una versión mejorada para la Parte A como se muestra en este ejemplo.

15

**Tabla 13. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4460-077	DSPC/DSPG/Col = 70/20/10	88,1	-20,5
Liposoma de ataque	4460-084	DPPC/Col/DOTAP = 73/11/16	91,56	23,0

**Tabla 14. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 7,4)**

Liposoma terapéutico (4460-077) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-084) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	9,5	5-CF	2,69%	3,04%	3,42%	4,25%	5,34%
0,5	0,1	9,4	5-CF	2,23%	2,86%	3,18%	4,53%	5,47%
0,5	0,5	4,0	5-CF	1,94%	2,51%	3,04%	4,99%	6,34%

**20 Ejemplo 8**

En este ejemplo, las composiciones de las Partes A y B de los liposomas se muestran en la Tabla 15. La Parte A (4460-090) del liposoma terapéutico contenía 5-CF que es el mismo que en el Ejemplo 6. El liposoma de ataque (4384-086) no contenía DOTAP lipídico cargado positivamente, pero contenía 30% en moles de TPGS. Los resultados mostrados en la Tabla 16 y representados en la Figura 8 indican que la liberación total de 5-CF a las 48 horas desde la Parte A (4460-090) del liposoma en PBS 1X a pH 7,4 aumentó de ~4% a ~20% en mediante la adición de una cantidad igual de liposoma de ataque. Los resultados también indican que la liberación de 5-CF del

25

liposoma terapéutico aumentó con la cantidad inicial creciente del liposoma de ataque. El liposoma terapéutico era un liposoma encubierto que contenía un nivel de colesterol del 40% en moles.

**Tabla 15. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4460-090	DSPC/DSPG/Col = 48/12/40	109,2	-17,4
Liposoma de ataque	4384-086	DPPC/Col/TPGS = 60/10/30	92,67	5,51

5

**Tabla 16. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS IX (pH = 7,4)**

Liposoma terapéutico (4460-090) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4384-086) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	9,5	5-CF	0,60%	0,85%	1,50%	2,98%	4,07%
0,5	0,1	9,4	5-CF	6,77%	7,53%	8,07%	8,99%	9,34%
0,5	0,5	4,0	5-CF	15,44%	16,20%	18,87%	19,64%	19,74%

### **Ejemplo 9**

10 En este ejemplo, las composiciones de los liposomas Parte A y B se muestran en la Tabla 17. La Parte A (4460-077) del liposoma terapéutico contenía 5-CF que es el mismo que en el Ejemplo 4. El liposoma terapéutico fue un liposoma encubierto que contenía 10% en moles de colesterol. La Parte B (4460-086) del liposoma de ataque contenía 30% en moles de TPGS en la composición y DOTAP de lípidos no cargados, como en el Ejemplo 5. Los resultados mostrados en la Tabla 18 y representados en la Figura 9 indican que la liberación total de 5-CF en 48 horas desde el liposoma (4460-077) aumentó de ~5% a ~34% mediante la adición de una cantidad igual de liposoma de ataque (4384-086) en PBS 1X a pH 7,4. Los resultados también indican que la liberación de 5-CF desde el liposoma (4460-077) aumentó con la cantidad inicial creciente de liposomas de ataque.

15

**Tabla 17. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4460-077	DSPC/DSPG/Col = 70/20/10	88,1	-20,5
Liposoma de ataque	4384-086	DPPC/Col/TPGS = 60/10/30	92,67	5,51

20

**Tabla 18. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 7,4)**

Liposoma terapéutico (4460-077) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4384-086) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	9,5	5-CF	2,69%	3,04%	3,42%	4,25%	5,34%
0,5	0,1	9,4	5-CF	19,30%	28,36%	30,29%	30,94%	31,05%
0,5	0,5	4,0	5-CF	23,40%	33,00%	34,29%	33,81%	33,55%

### **Ejemplo 10**

25 En este ejemplo, las composiciones de las Partes A y B de los liposomas se muestran en la Tabla 19. La Parte A (4460-090) del liposoma terapéutico contenía 5-CF, como en el Ejemplo 6. El liposoma terapéutico era un liposoma no encubierto que contenía 40% en moles de colesterol. La Parte B (4460-075) del liposoma de ataque contenía

32% en moles de TPGS y 16% en moles de DOTAP, que proporcionan cargas positivas al liposoma de ataque. Los resultados mostrados en la Tabla 20 y representados en la Figura 10 indican que la liberación total de 5-CF del liposoma terapéutico (4460-090) aumentó de ~5% a ~26% con la adición de liposomas de ataque (4460-075) incluso cuando el valor de pH se cambió de 7,4 a 5,0. Los resultados muestran claramente que la liberación total de liposoma (4460-090) aumentó con la cantidad inicial creciente del liposoma de ataque.

5

**Tabla 19. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partículas (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	4460-090	DSPC/DSPG/Col = 48/12/40	109,2	-17,4
Liposoma de ataque	4460-075	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	80,3	11,4

**Tabla 20. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 5,0)**

Liposoma terapéutico (4460-090) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 5,0) Añadido (mL)	Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	9,5	5-CF	0	0	1,18%	9,72%	25,60%
0,5	0,1	9,4	5-CF	3,61%	4,94%	5,40%	13,35%	23,37%
0,5	0,5	4,0	5-CF	11,88%	13,87%	14,89%	21,92%	29,02%

10

**Ejemplo 11**

En este ejemplo, las composiciones de las Partes A y B de los liposomas se muestran en la Tabla 21. El liposoma terapéutico (NLICOV003F-02) contenía Oxaliplatino, como en el Ejemplo 1. El liposoma terapéutico era un liposoma no encubierto que contenía 10% en moles de colesterol. El liposoma de ataque (4460-104) contenía 32% en moles de TPGS y 16% en moles de DOTAP, proporcionando cargas positivas al liposoma de ataque. Los resultados mostrados en la Tabla 22 y representados en la Figura 11 indican que la liberación total de liposomas terapéuticos (COV003F-02) a las 48 horas aumentó de ~5% a ~25% mediante la adición del 20% de liposomas de ataque (4460-104) en PBS 1X a pH 7,4 y pH 5,0.

15

20

**Tabla 21. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	NLI COV003F-02	DSPC/DSPO/Col = 70/20/10	83,6	-22,6
Liposoma de ataque	4460-104	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	76,5	5,89

**Tabla 22. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 5,0)**

Liposoma terapéutico (COV003F-02) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-104) Cantidad (mL)	PBS 1X Agregado (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,1	4,4, pH = 7,4	Oxaliplatino	13,59%	27,78%	28,95%	31,12%	23,45%
0,5	0,1	4,4, pH = 5,0	Oxaliplatino	12,93%	29,32%	28,37%	25,97%	26,78%

25

**Ejemplo 12**

En este ejemplo, las composiciones de las Partes A y B de los liposomas se muestran en la Tabla 23. El liposoma

terapéutico (NLI 4481101) contenía cisplatino. El liposoma terapéutico era un liposoma encubierto con 40% en moles de colesterol. El liposoma de ataque (4460-104) contenía 32% en moles de TPGS y 16% en moles de DOTAP, proporcionando cargas positivas al liposoma de ataque. Los resultados mostrados en la Tabla 23 y representados en la Figura 12 indican que la liberación de liposomas terapéuticos (NLI4481101) después de 48 horas aumentó de ~1% a ~5% mediante la adición de liposomas de ataque (4460-104) en PBS 1X tanto a pH 7,4 como a pH 5,0. Los resultados también indican que la liberación de cisplatino del liposoma terapéutico aumentó con la cantidad creciente del liposoma de ataque. El liposoma terapéutico era un liposoma encubierto que contenía 40% en moles de colesterol. El liposoma de ataque tenía carga opuesta y contenía 32% en moles de TPGS.

5

10

**Tabla 23. Componentes del dualsoma**

Dualsoma	Nombre	Composición (% en moles)	Tamaño de partícula (volumen nm)	Potencial Zeta (mV)
Liposoma terapéutico	NLI 4481101	HSPC/Col/DSPE-PEG (2000) = 55/40/5	107,1	-0,99
Liposoma de ataque	4460-104	DPPC/Col/TPGS/DOTAP = 42/10/32/16	76,5	5,89

**Tabla 24. Liberación in vitro de Dualsoma en PBS 1X (pH = 7,4 y pH = 5,0)**

Liposoma terapéutico (NLI4481101) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-104) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 7,4) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Liberación Inmediata después de mezclar	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	4,5	Cisplatino	0	0	0	0	1,39%
0,5	0,1	4,4	Cisplatino	1,55%	0	1,39%	1,98%	2,34%
0,5	0,5	4,0	Cisplatino	2,61%	2,67%	3,32%	4,17%	4,70%

Liposoma terapéutico (NLICOV003F-02) Cantidad (mL)	Liposoma de ataque (4460-075) Cantidad (mL)	PBS 1X (pH = 5,0) Añadido (mL)	Agente Terapéutico Encapsulado	Inmediatamente después del mezclado.	Liberación al cabo de 1 hora	Liberación al cabo de 6 horas	Liberación al cabo de 24 horas	Liberación al cabo de 48 horas
0,5	0,0	4,5	Cisplatino	0	0	0	0	1,56%
0,5	0,1	4,4	Cisplatino	1,64%	0	0	1,79%	2,56%
0,5	0,5	4,0	Cisplatino	2,68%	2,83%	3,18%	4,35%	5,50%

15

## REIVINDICACIONES

1. Una primera composición que comprende un primer liposoma que comprende un agente terapéutico, y una segunda composición que comprende una nanopartícula lipídica que comprende un agente activador no iónico, para uso secuencial o concurrente en la administración de un agente terapéutico a un sujeto; en donde el agente activador no iónico se selecciona del grupo que consiste en: succinato de D- $\alpha$ -tocoferil polietilenglicol (TPGS), estearato de polioxietileno 40, p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-feniléter de polietilenglicol, isooctilfenil éter de polioxietileno (2), dinonilfenil éter de polioxietileno (150), éster 2,3-dihidroxi propílico de ácido dodecanoico, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán, monoestearato de polioxietileno (20) sorbitán y monooleato polioxietileno (20) sorbitán. con lo que aumenta la liberación del agente terapéutico del liposoma después del uso de la nanopartícula lipídica, con respecto a la liberación del agente terapéutico del liposoma sin el uso de la nanopartícula lipídica.
2. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 1, en donde el primer liposoma comprende uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en un fosfolípido, un esteroide y un lípido catiónico.
3. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 2, en donde el fosfolípido se selecciona entre una fosfatidilcolina, un fosfatidilglicerol, una fosfatidiletanolamina, una fosfatidilserina, un fosfatidilinositol, y un ácido fosfatídico, y/o en donde el esteroide es colesterol.
4. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 3, en donde la fosfatidilcolina es DSPC, y/o en donde el fosfatidilglicerol es DSPG, o en donde la fosfatidiletanolamina es DSPE-PEG (2000).
5. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 1, en donde la nanopartícula lipídica se selecciona del grupo que consiste en: un segundo liposoma, una micela, y mezclas de los mismos, opcionalmente en donde la nanopartícula lipídica es un segundo liposoma.
6. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 5, en donde el segundo liposoma comprende uno o más lípidos seleccionados del grupo que consiste en un fosfolípido, un esteroide y un lípido catiónico.
7. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 6, en donde el fosfolípido se selecciona entre una fosfatidilcolina, un fosfatidilglicerol, una fosfatidiletanolamina, una fosfatidilserina, un fosfatidilinositol, y un ácido fosfatídico, y/o en donde el esteroide es colesterol, o en donde el lípido catiónico es DOTAP.
8. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 7, en donde la fosfatidilcolina es DPPC.
9. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 1, en donde el agente activador no iónico es TPGS.
10. La primera composición y la segunda composición de la reivindicación 1, en donde el primer liposoma comprende 40-80% en moles de DSPC, 5-50% en moles de colesterol, 0-30% en moles de DSPG y 0-10% en moles de DSPE-PEG (2000), y/o en donde la nanopartícula lipídica es un segundo liposoma que comprende 40-70% en moles de DPPC, 5-20% en moles de colesterol, 0-20% en moles de DOTAP y 20-40% en moles de TPGS.
11. La primera composición y la segunda composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente terapéutico se selecciona entre cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, gemcitabina, 5-fluorouracilo, doxorubicina y un taxano, opcionalmente en donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en cisplatino y oxaliplatino.
12. La primera composición y la segunda composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el primer liposoma y la nanopartícula lipídica son para uso por inyección intraperitoneal.
13. La primera composición y la segunda composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto es un ser humano.
14. 7. La primera composición y la segunda composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
- i) la nanopartícula lipídica se administra después de la administración del primer liposoma, opcionalmente en donde la nanopartícula lipídica se administra después de que el primer liposoma se haya acumulado en un sitio diana dentro del sujeto; y/o
  - ii) en donde la administración de la nanopartícula lipídica aumenta la liberación del agente terapéutico del primer liposoma al menos 3 veces, 10 veces o 25 veces con respecto a la administración del primer liposoma

sin el uso de la nanopartícula lipídica.

15. Un kit para suministrar un agente terapéutico a un sujeto, que comprende:

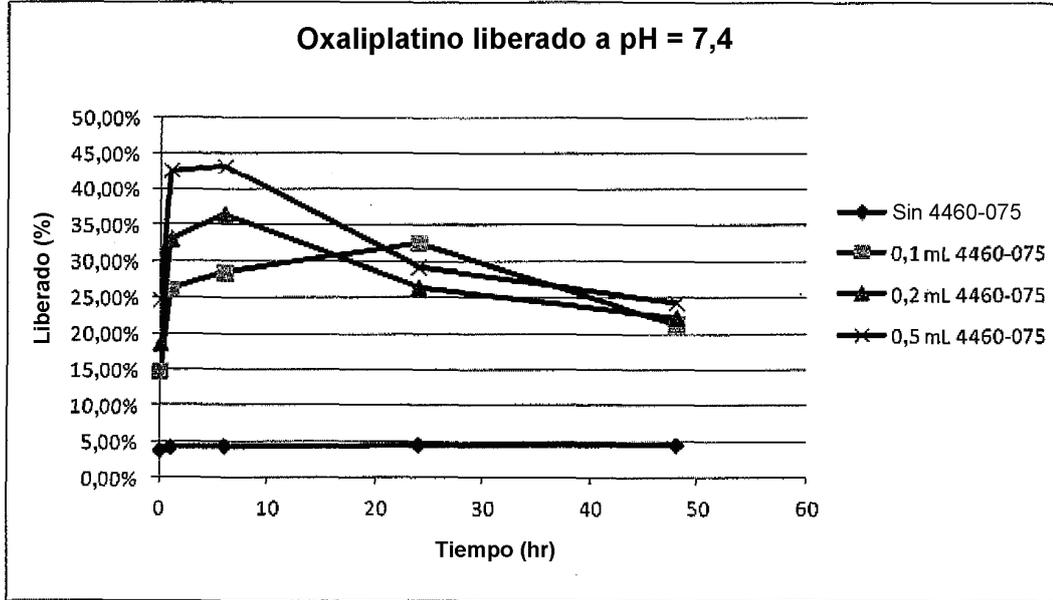
- 5 a) una primera composición que comprende un primer liposoma que contiene un agente terapéutico; y  
b) una segunda composición que comprende una nanopartícula lipídica que contiene un agente activador no  
iónico; en donde el agente activador no iónico se selecciona del grupo que consiste en: succinato de D- $\alpha$ -  
10 tocoferil polietilenglicol (TPGS), estearato de polioxietileno 40, p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-feniléter de  
polietilenglicol, isoocetilfenil éter de polioxietileno (2), dinonilfenil éter de polioxietileno (150), éster 2,3-  
dihidroxipropílico de ácido dodecanoico, monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán, monopalmitato de  
polioxietileno (20) sorbitán, monoestearato de polioxietileno y monooleato de polioxietileno (20) sorbitán;

en donde la primera y segunda composiciones se almacenan por separado antes de la administración al sujeto.

15

Figura 1

A



B

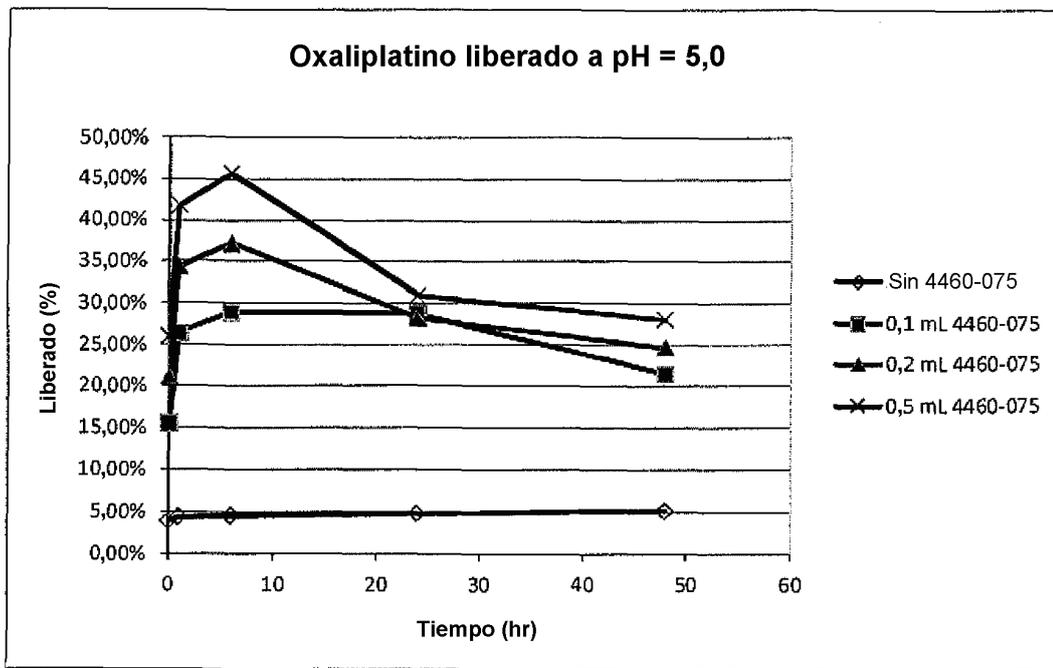
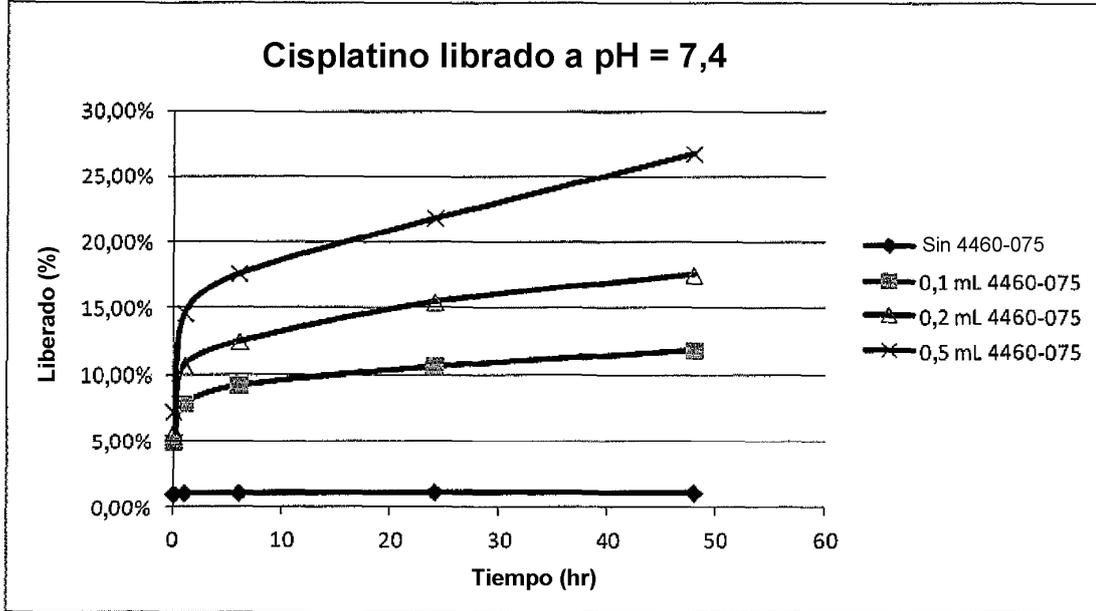


Figura 2

A



B

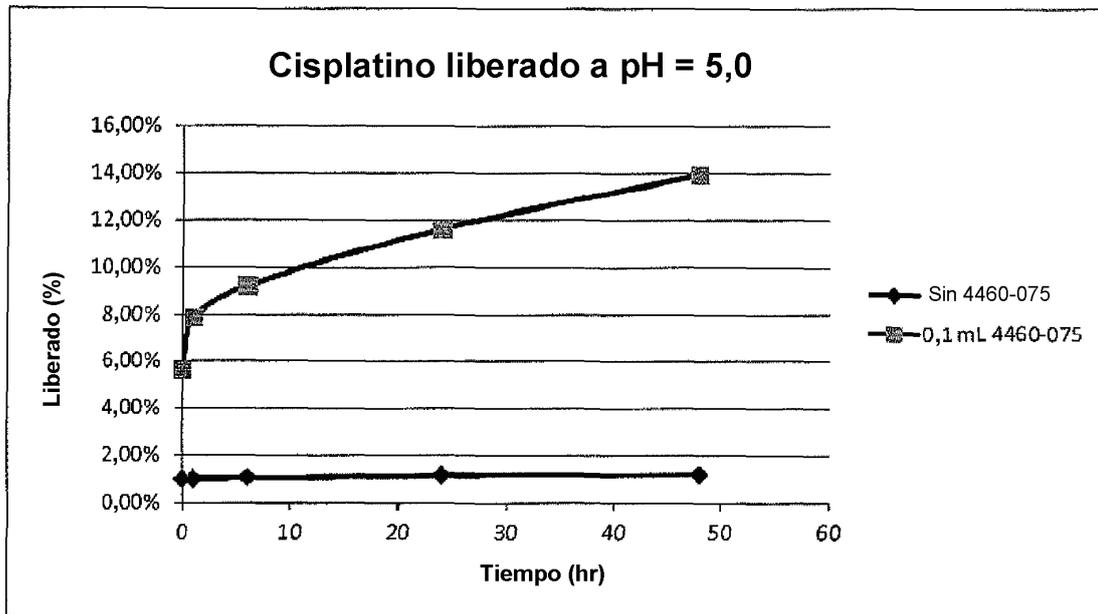


Figura 3

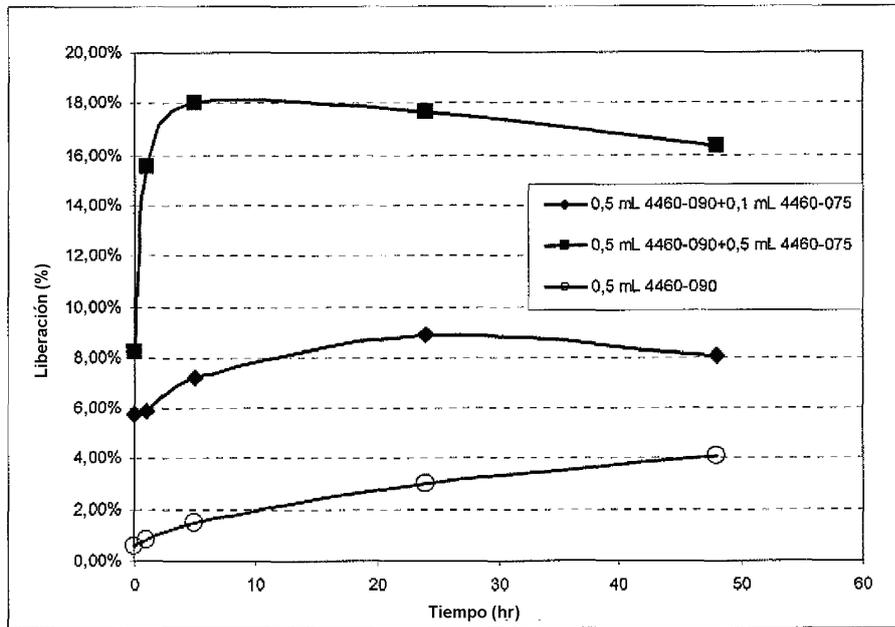


Figura 4

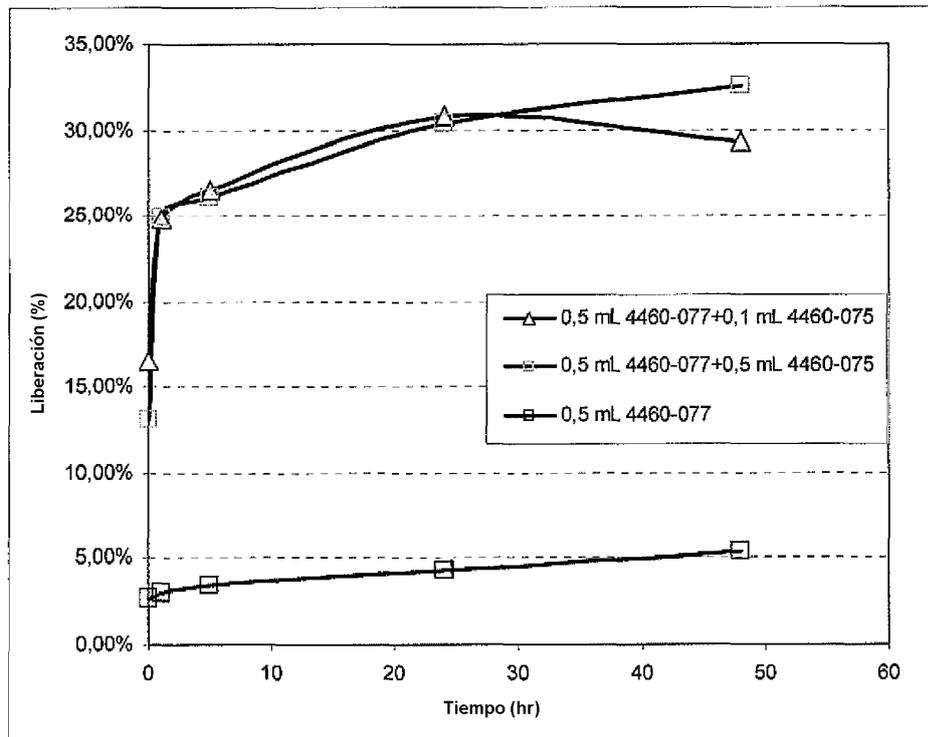


Figura 5

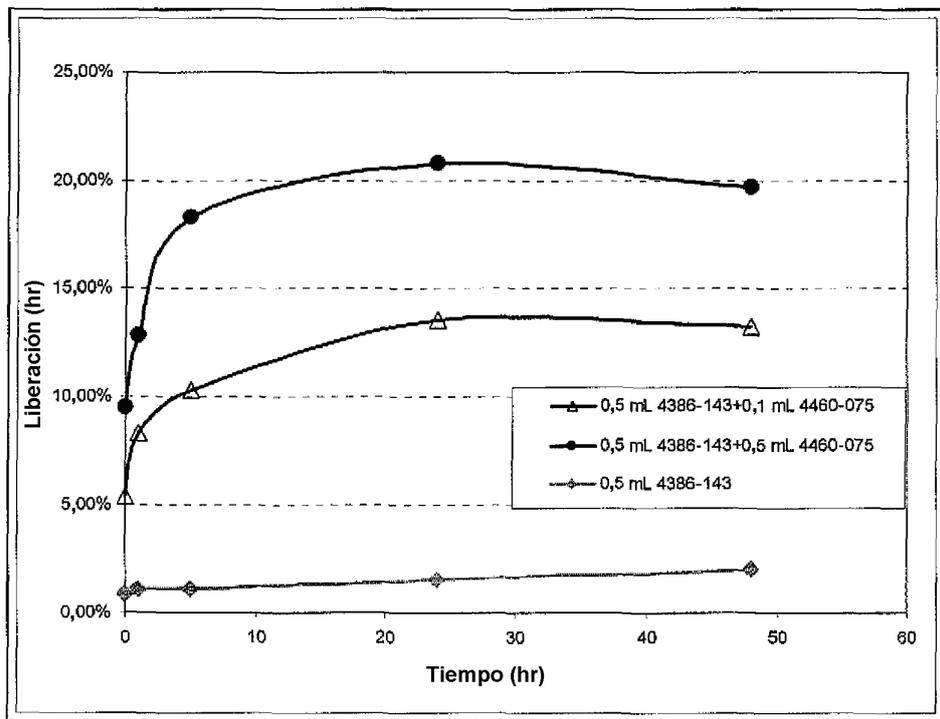


Figura 6

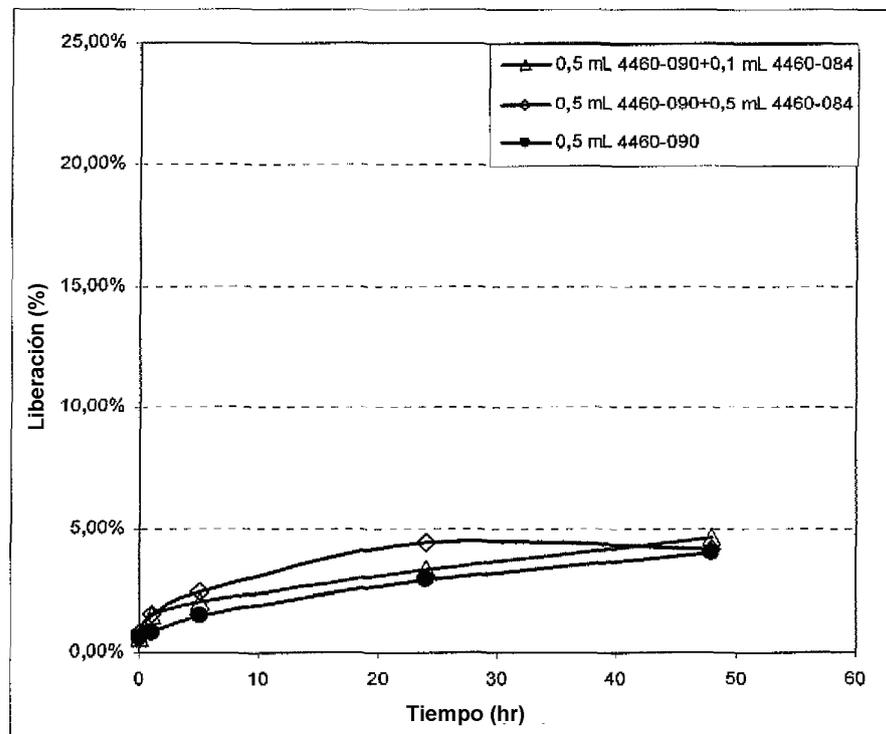


Figura 7

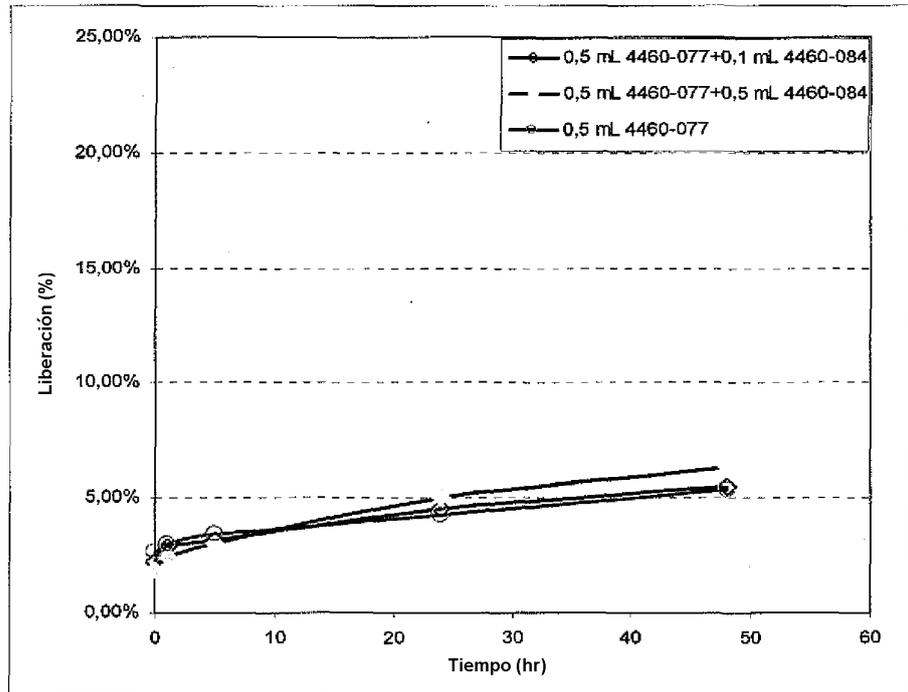


Figura 8

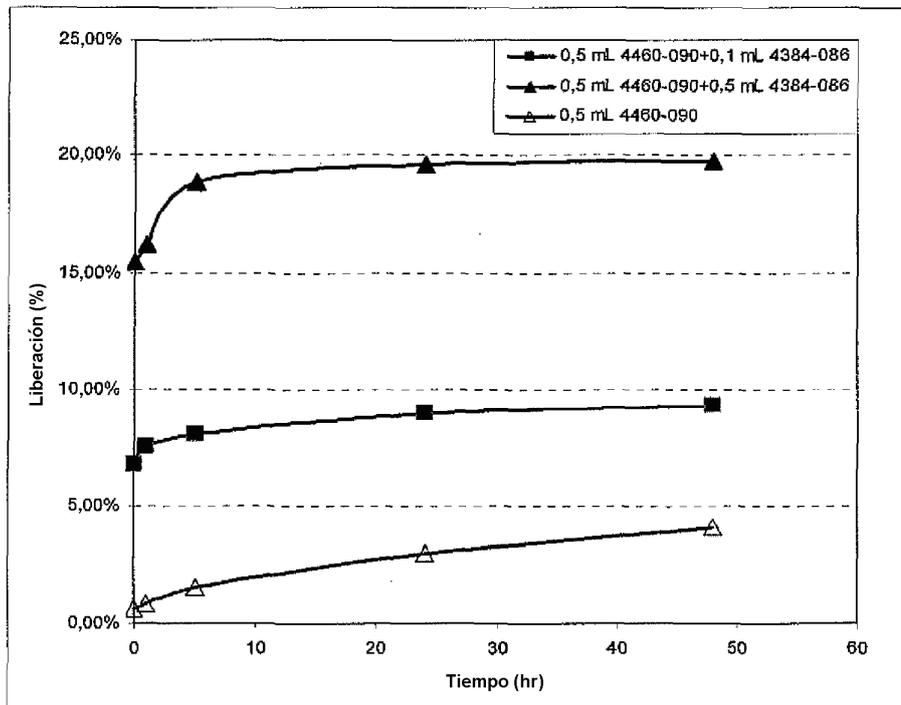


Figura 9

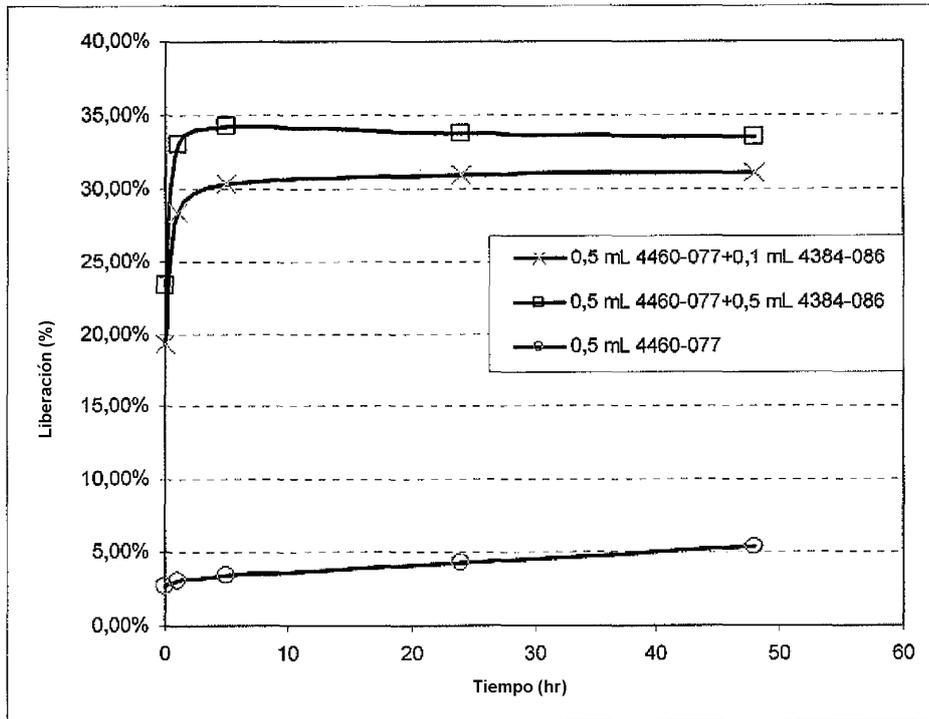


Figura 10

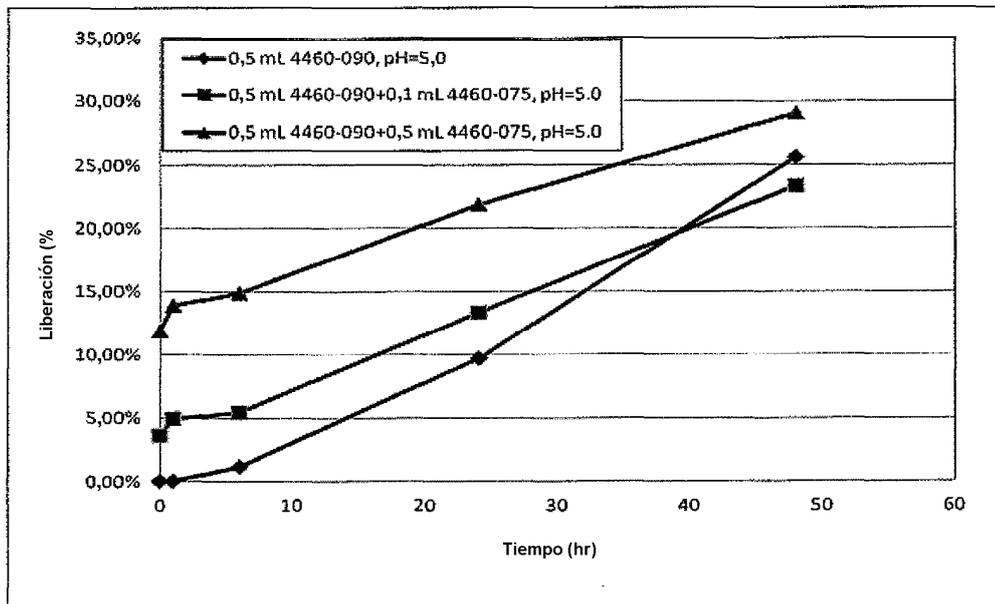


Figura 11

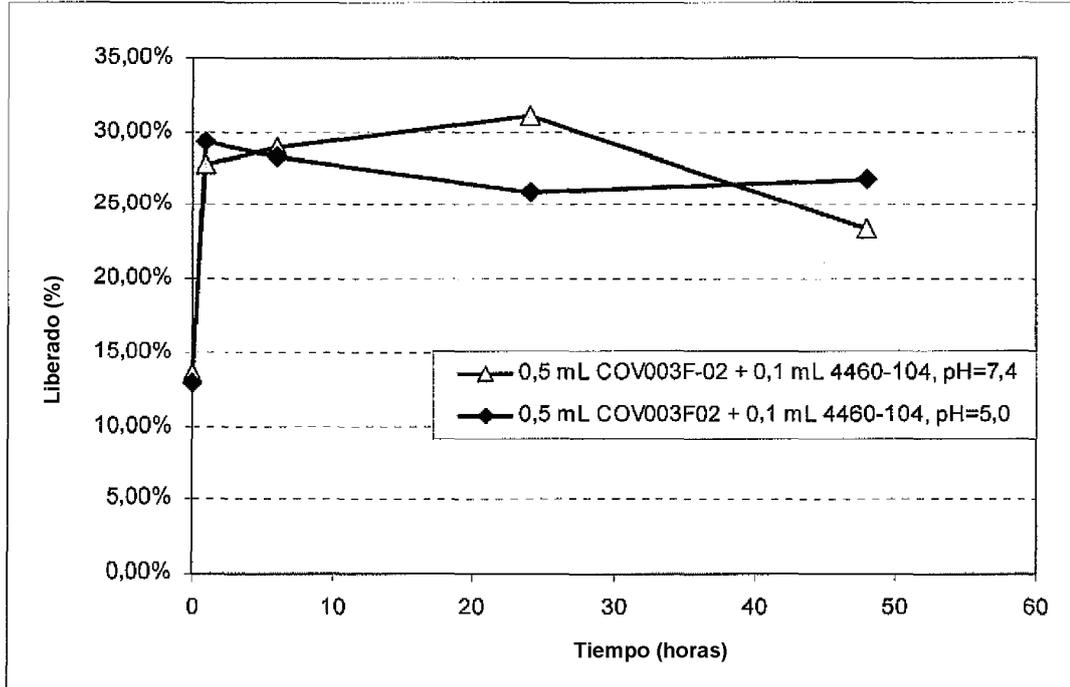
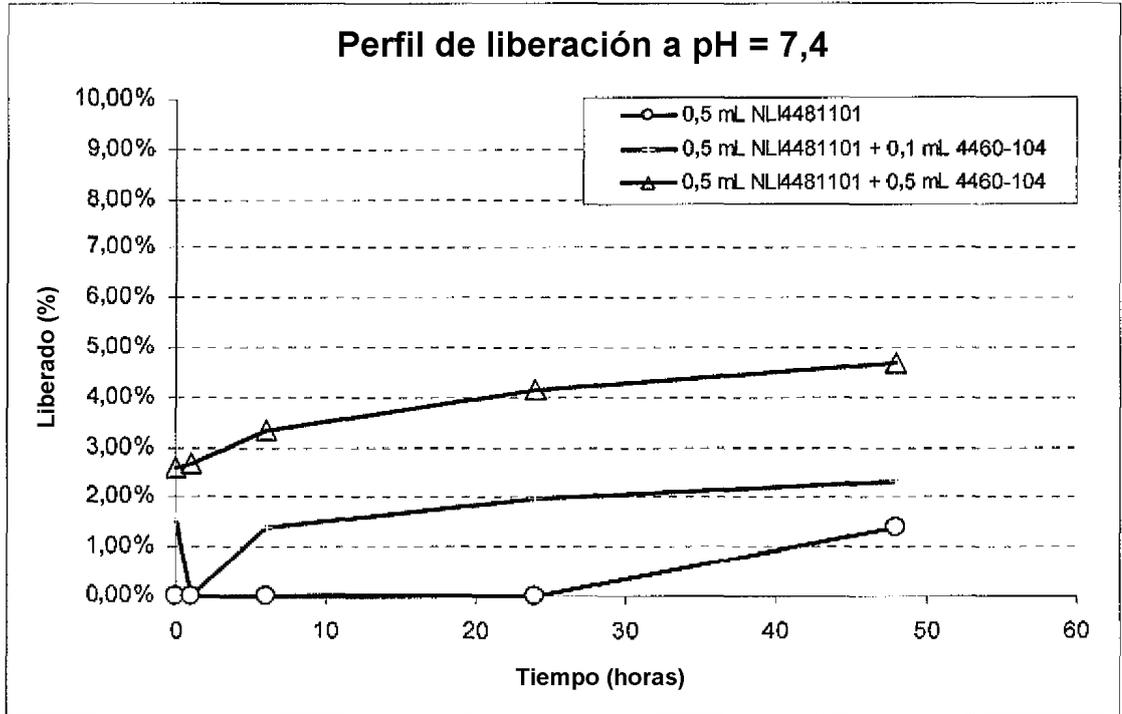


Figura 12

A



B

